



(12) PATENT

(19) NO

(11) 340598

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A23L 33/00 (2016.01)

A23L 33/135 (2016.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20065195	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2005.02.23 PCT/US2005/06129
(22)	Inng.dag	2006.11.13	(85)	Videreføringssdag	2006.11.13
(24)	Løpedag	2005.02.23	(30)	Prioritet	2004.04.26, US, 60/565,668 2004.10.19, US, 10/969,314
(41)	Alm.tilgj	2007.01.18			
(45)	Meddelt	2017.05.15			
(73)	Innehaver	The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior UNIV, 1705 El Camino Real, US-CA94306-1106 PALO ALTO, USA			
(72)	Oppfinner	Alvine Pharmaceuticals Inc, 75 Shoreway Road, Suite B, US-CA94070 SAN CARLOS, USA Lu Shan, 5631 Hummingbird Street, US-TX77096 HOUSTON, USA Michael Bethune, 119 Quellen Court, Apartment 603, US-CA94305 STANFORD, USA Chaitan Khosla, 740 La Para Avenue, US-CA94306 PALO ALTO, USA Jonathan Gass, 4061 Steeplechase Drive, US-PA19426 COLLEGEVILLA, USA			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Terapeutiske enzymformuleringer og anvendelser derav			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 03068170 A2 US 20030215438 A1			
(57)	Sammendrag				

Farmasøytiske formuleringer av glutenaseenzymer er tilveiebrakt. Enzymene finner spesielt anvendelse i behandlingen av en cøliaki eller dermatitis herpetiformis pasient.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

I 1953 ble det gjenkjent at inntak av gluten, et alminnelig ernæringsprotein tilstede i hvete, bygg og rug forårsaker sykdom hos sensitive individer. Gluten er en kompleks
5 blanding av glutamin- og prolinrikt glutein og prolaminmolekyler, som er tenkt til å være ansvarlige for sykdomsinduksjon. Inntak av slike proteiner ved sensitive individer produserer utflating av den normalt lukseriøse, teppelignende, epitelkledningen av tynntarmen kjent for å være ansvarlig for effektiv og grundig terminal fordøyning av peptider og andre næringsstoffer. Kliniske symptomer for cøliaki inkluderer utmattelse,
10 kronisk diaré, dårlig absorpsjon av næringsstoffer, vekttap, abnominal distensjon, anemi, så som en vesentlig forsterket risiko for utviklingen av osteoporose og intestinale maligniteter (lymfom og karsinom). Sykdommen har en hyppighet på omtrentlig 1 av 200 i europeiske populasjoner.

15 En relatert sykdom er dermatitt herpetiformis, som er et kronisk utbrudd karakterisert ved klynger av sterkt pruritiske vesikler, knuter og urticaria-lignende lesjoner. IgA avsetninger forekommer i nesten all normal fremtredende og perilesjonale hud. Asymptomatisk gluten-sensitiv enteropati er funnet i 75 til 90% av pasienter og i noen av deres slektninger. Begynnelse er vanligvis gradvis. Kløe og brenning er kraftig, og
20 oppskraping skjuler ofte de primære lesjonene med eksemdannelse av nærliggende hud, som fører til en feilaktig diagnose av eksem. Streng troskap til en glutenfri diett for forlengede perioder kan kontrollere sykdommen hos noen pasienter, som unngår eller reduserer behovene for medikamentterapi. Dapson, sulfapyridin og kolchikiner er noen ganger preskribert for å avlaste kløing.

25 Cøliaki er ofte betraktet til å være en autoimmun sykdom og antistoffene funnet i serumet av pasienter støtter en teori av en immunologisk natur av sykdommen. Antistoffer til vev transglutaminase (tTG) og gliadin viser seg i nesten 100% av pasientene med aktiv cøliaki, og nærværet av slike antistoffer, spesielt av IgA klassen,
30 har blitt benyttet for å stille en diagnose for sykdommen.

Den største delen av pasienter uttrykker HLA-DQ2 [DQ(a1*0501, b1*02)] og/eller DQ8 [DQ(a1*0301, b1*0302)] molekyler. Det er trodd at tarmskade er forårsaket ved interaksjoner mellom spesifikke gliadinoligopeptider og HLA-DQ2 eller DQ8

antigenet, som videre induserer proliferasjon av T lymfocytter i sub-epitellagene. T hjelper 1 celler og cytokiner synes å spille en viktig rolle i en lokal inflammatorisk prosess som fører til villus atrofi av tynntarmen.

- 5 Ved det foreliggende tidspunktet er det ingen god terapi for sykdommen, med unntak å fullstendig unngå alle matvarer som inneholder gluten. Selv om inndraging av gluten har transformert prognosen for barn og hovedsakelig forbedret den for voksne, dør fortsatt noen av sykdommen, hovedsakelig voksne som hadde kraftig sykdom ved starten. En viktig årsak til død er lymforetikulær sykdom (spesielt intestinalt lymfom).
- 10 Det er ikke kjent hvorvidt en glutenfri diett reduserer denne risikoen. Tydelig klinisk tilbakegang er ofte assosiert med histologisk tilbakefall som er detektert bare ved inspiserende biopsier eller ved økt EMA titere.

Gluten er så bredt benyttet, for eksempel i kommersielle supper, sauser, is krem, pølser og andre matvarer, at pasienter trenger detaljerte lister av matvarer som skal unngås og ekspertråd fra en ernæringseksperter kjent med cøliaki. Inntak av til og med små mengder av gluten kan hindre bedring eller indusere tilbakefall. Supplerende vitaminer, mineraler og hematinmidler kan også være nødvendig, avhengig av lidelse. Noen få pasienter responderer dårlig eller ikke i det hele tatt til tilbaketrekking av gluten, enten fordi

15 20 diagnosen er ukorrekt eller fordi sykdommen er vanskelig å behandle. I det sistnevnte tilfellet kan orale kortikosteroider (for eksempel prednison 10 til 20 mg bid) indusere respons.

WO 03/068170 vedrører administrering av en effektiv dose av glutenase til en pasient med cøliaki eller dermatitis herpetiformis for å redusere nivåene av toksiske glutenoligopeptider, og derved redusere eller eliminere de skadelige effektene av gluten.

Med henblikk på den alvorlige og utstrakte naturen av cøliaki, er forbedrede fremgangsmåter for behandling eller forbedring av effektene av sykdommen nødvendig.

30 Den foreliggende oppfinnelsen adresserer slike behov.

SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer en formulering for anvendelse i behandling av cøliaki, omfattende en prolylendopeptidase (PEP) og en
 5 glutaminendoprotease, sammen med et farmasøytisk akseptabelt bindemiddel. Nevnte PEP kan være *Flavobacterium meningosepticum* PEP, *Myxococcus xanthus* PEP, *Sphingomonas capsulata* PEP eller *Penicillium citrinum* PEP. Nevnte glutaminendoprotease kan være cysteinprotease B fra *Hordeum vulgare*.

10 Ytterligere aspekter ved oppfinnelsen er som angitt i de medfølgende kravene.

Det er også beskrevet rensset *Myxococcus xanthus* PEP, biologisk aktive fragmenter eller derivater derav; og farmasøytiske formuleringer derav. Enzymet kan bli uttrykt i heterolog vertcelle, for eksempel en heterolog bakterie, og rensset ved
 15 affinitetskromatografi. Det er funnet at enzymet kan bli rensset, lyofilisert og formulert i enhetsdoser, slik som tablett, enterisk belagte kapsler osv., mens de hovedsakelig beholder biologisk aktivitet. Formuleringer av interesse inkluderer formuleringer hvor enzymet finnes innenfor et enterisk belegg som tillater levering av det aktive midlet til tarmen og formuleringer hvor de aktive midlene er stabilisert for å motstå fordøyning i
 20 sure forhold i magen. Formuleringen kan omfatte et eller flere enzymer eller en blanding eller "cocktail" av midler som har ulike aktiviteter.

Oppfinnelsen er beskrevet i mer detalj nedenfor.

25 KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Fig. 1. Effekt av pH på omsetningsantallene (kcat) av FM PEP, MX PEP og SC PEP.

Fig. 2. Resistens av FM PEP og MX PEP for inaktivering ved gastriske og pankreatiske
 30 enzymer. Pankreatisk enzymstabilitet ble evaluert ved å behandle 5 U/ml av FM PEP og MX PEP med 1 mg/ml trypsin, 1 mg/ml chymotrypsin, 0,2 mg/ml elastase og 0,2 mg/ml karboksypeptidase A (40 mM fosfat, pH = 6,5). Pepsinstabilitet ble testet ved å behandle FM PEP og MX PEP (5 U/ml) med 1 mg/ml pepsin (pH = 2, 20 mM HCl).

Fig. 3. Setespesifisitet av PQQQLPYPQQQLP hydrolyse ved individuelle PEPer. HPLC-UV (215 nm) skisseringer er vist for hver reaksjonsblanding. Initielt kløyvede fragmenter (100 μ M (SEQ ID NO:11) PQQQLPYPQQQLP, 0,1 μ M enzym, t = 5 min) ble identifisert ved tandem massespektrometri. Utgangsmaterialet (SEQ ID NO:11) PQQQLPYPQQQLP og de kløyvede fragmenter A: (SEQ ID NO:11, aa. 1-8) PQQQLPYP, B: (SEQ ID NO:11, aa 7-13) YPQQQLP, C: (SEQ ID NO:12, aa 1-6) PQQQLP, D: (SEQ ID NO:11, aa 2-6) QPQLP) er indikert i skisseringene.

10 Fig. 4A-4C. Hydrolyse av (SEQ ID NO:12) LQLQPFPPQQQLPYPQQQLPYP
 QPQLPYPQQQPF ved FM PEP, MX PEP og SC PEP. (A) Tidsavhengighet av
 hydrolyse i nærvær av 10 μ M substrat og 0,1 μ M enzym. Substratet viste seg som en
 dublett ved en retensjonstid på ca. 18 min, på grunn av nærværet av like mengder av 32-
 meren hvorfra N-terminal Leu er deletert; nærværet av denne kontaminanten påvirker
 15 ikke analyse. Fra det gjenværende toppområdet ble mengdene av substrat (33-mer + 32-
 mer) forsvinning kalkulert som 2,3 μ M/min (FM PEP), 0,43 μ M/min (MX PEP) og 0,07
 μ M/min (SC PEP). (B) Initielt kløyvede fragmenter observert på grunn av hydrolyse
 ved FM PEP (t = 1 min) og MX PEP (t = 5 min). (C) Oppsummering av initielt
 kløyvede fragmenter fra FM PEP og MX PEP katalysert hydrolyse av 33-mer substratet.

20

Fig. 5A-5C. Kompetitiv proteolyse av (SEQ ID NO:11) PQQQLPYPQQQLP og (SEQ
 ID NO:12) LQLQPFPPQQQLPYPQQQLPYPQQQLPYPQQQPF ved hvert PEP. 10 μ M
 av det lengste peptidet og 50 μ M av det korteste peptidet ble ko-inkubert med 0,1 μ M
 av (A) FM PEP; (B) MX PEP; (C) SC PEP.

25

Fig. 6A-6B. Kompetitiv proteolyse av (SEQ ID NO:11) PQQQLPYPQQQLP (50 μ M)
 og (SEQ ID NO:12) LQLQPFPPQQQLPYPQQQLPYPQQQLPYPQQQPF (10 μ M) i
 nærværet av 30 mg/ml pepsinbehandlet gluten. Denne komplekse blandingen av
 substrater ble behandlet under fysiologiske forhold med en blanding av pankreatiske
 30 enzymer (trypsin, chymotrypsin, karboksypeptidase, elastase), børstesøm-membran
 enzymer (derivert fra rottetyntarm) og enten (A) FM PEP eller (B) MX PEP.

Fig. 7. (SEQ ID NO:12) Proteolyse LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (5 μ M) ko-perfusert med individuelle PEP'er (0,1 μ M) i lumen av tynntarm av en anestetisert rotte. Hver enzymsubstratblanding ble introdusert via et kateter inn i et 15-20 cm segment av øvre jejunum. Prøver ble samlet i den andre enden av segmentet og analysert ved UV-HPLC (215 nm). Kontrollen uten noe PEP er vist i toppskissen.

DETALJERT BESKRIVELSE AV UTFØRELSESFORMENE

Glutenaseenzymer og enzymformuleringer er nyttige i behandlingen av glutenintoleranse. Enzymene reduserer nivåene av toksiske glutenoligopeptider i matvarer, enten før eller etter inntak ved en pasient. Enzymer av interesse inkluderer prolyl endopeptidaser (PEP), for eksempel *Myxococcus xanthus* PEP; og endoproteaser, for eksempel *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* EPB2. Bestemte glutenoligopeptider kjent til å være resistente for kløyving ved gastriske og pankreatiske enzymer er fordøyd ved slike enzymer, som derved hindrer eller lindrer deres toksiske effekter i pasienter. Glutenintoleranse er hovedsakelig assosiert med cøliaki og dermatitt herpetiformis, imidlertid er det også kjent i fagfeltet til å være funnet i andre pasienter, for eksempel assosiert med autisme. Slike pasienter kan også bli behandlet med fremgangsmåtene som er beskrevet her.

I noen pasienter tillater disse fremgangsmåtene og sammensetningene pasienten å innta gluten uten alvorlige helsekonsekvenser, mye det samme som hos individer som ikke lider av noen av disse tilstandene. I noen utførelsesformer omfatter formuleringene av oppfinnelsen en glutenase omsluttet av et enterisk belegg som tillater levering av det aktive midlet/midlene til tarmen; i andre utførelsesformer er det aktive midlet/midlene stabilisert for å motstå fordøyning i sure forhold av magen. I noen tilfeller har det aktive midlet/midlene hydrolytisk aktivitet under sure pH-forhold og kan derfor starte den proteolytiske prosessen på toksiske glutensekvenser i selve magen. Alternative fremgangsmåter av administrasjon tilveiebrakt ved oppfinnelsen inkluderer genetisk modifikasjon av pasientceller, for eksempel enterocytter, til å uttrykke økte nivåer av glutenaser; og introduksjonen av mikroorganismer som uttrykker slike glutenaser for å transient eller permanent kolonisere pasientens fordøyelseskanal. Slike modifiserte

pasientceller (som inkluderer celler som ikke er derivert fra pasienten, men som ikke er immunologisk avvist når administrert til pasienten) og mikroorganismer er, i noen tilfeller, formulert i et farmasøytisk akseptabelt bindemiddel, eller introdusert i matvarer. Det er også beskrevet matvarer forbehandlet eller kombinert med en glutenase og fremgangsmåter for å behandle mat for å fjerne de toksiske oligopeptider av gluten.

Formuleringene ifølge oppfinnelsen kan bli benyttet for profylaktiske så vel som terapeutiske formål. Som benyttet her, refererer betegnelsen "behandling" både til forebyggingen av sykdom og behandlingen av en sykdom eller en pre-eksisterende tilstand. Oppfinnelsen tilveiebringer et significant fremskritt i behandlingen av pågående sykdom, for å stabilisere eller forbedre de kliniske symptomene av pasienten. Slik behandling er ønskelig utført før tap av funksjon i det rammede vevet, men kan også hjelpe til å gjenoppbygge tapt funksjon eller forebygge ytterligere tap av funksjon. Bevis for terapeutisk effekt kan være enhver reduksjon i kraftigheten av sykdom, spesielt som målt ved kraftigheten av symptomer slik som utmattelse, kronisk diare, dårlig absorpsjon av næringsstoffer, vekttap, abdominal distensjon, anemi og andre symptomer før cøliaki. andre sykdomindisier inkluderer nærværet av antistoffer spesifikke for glutener, nærværet av antistoffer spesifikke for vevstransglutaminase, nærværet av pro-inflammatoriske T celler og cytokiner, skade på villus strukturen av tynntarmen som bevis ved histologisk eller annen undersøkelse, forsterket intestinal permeabilitet og lignende.

Pasienter som kan bli behandlet med formuleringene ifølge oppfinnelsen inkluderer dem diagnostisert med cøliaki gjennom en eller flere serologiske tester, for eksempel anti-gliadin antistoffer, anti-transglutaminase antistoffer, anti-endomysiale antistoffer; endoskopisk evaluering, for eksempel for å identifisere cøliakilesjoner; histologisk bestemmelse av tynntarm mucosa, for eksempel for å detektere villøs atrofi, crypt hyperplasi, infiltrering av intra-epitel lymfocytter; og alle GI symptomer avhengig av inklusjon av gluten i dietten.

30

Gitt tryggheten for orale proteaser, kan de også finne en profylaktisk anvendelse i høyrisikopopulasjoner, slik som Type I diabetics, familiemedlemmer av diagnostiserte

cøliakipasienter, HLA-DQ2 positive individer, og/eller pasienter med gluten-assosierte symptomer som enda ikke har gjennomgått formell diagnose. Slike pasienter kan bli behandlet med vanlig dose eller lav-dose (10-50% av den vanlige dosen) enzym. På lignende måte er også midlertid høy-doseanvendelse av et slikt middel også regnet med
 5 for pasienter som kommer seg av gluten-mediert enteropati hvor tarmfunksjon enda ikke har vendt tilbake til det normale, for eksempel som bedømt ved fekale fettkestre-sjonstester.

Pasienter som kan ha fordel av den foreliggende oppfinnelsen kan være av enhver alder
 10 og inkluderer voksne og barn. Barn har spesiell fordel fra profylaktisk behandling ettersom forebygging av tidlig eksponering for toksiske glutenpeptider kan hindre initiell utvikling av sykdommen. Barn egnet for profylakse kan bli identifisert ved genetisk testing for predisposisjon, for eksempel ved HLA typing; ved familiehistorie, ved T celltest eller ved andre medisinske hjelpemidler. Som det er kjent i fagfeltet, kan
 15 doseringer bli justert for pediatrik anvendelse.

Oppfinnelsen så vel som tester for å bestemme dens virkeevne i en spesiell pasient eller anvendelse, kan bli utført i overensstemmelse med lærdommene her ved å benytte prosedyrer standard i fagfeltet. Praktiseringen av den foreliggende oppfinnelsen kan
 20 derfor benytte konvensjonelle teknikker av molekylær biologi (som inkluderer rekombinante teknikker), mikrobiologi, cellebiologi, biokjemi og immunologi innenfor rekkevidden for dem av dyktighet i fagfeltet. Slike teknikker er fullstendig forklart i litteraturen, slik som "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", andre utgave (Sambrook *et al.*, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, utg., 1984); "Animal
 25 Cell Culture" (R.I. Freshney, utg., 1987); "fremgangsmåter in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D.M. Weir & C.C. Blackwell, utg.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, utg., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel *et al.*, utg., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis *et al.*, utg., 1994); og "Current
 30 Protocols in Immunology" (J.E. Coligan *et al.*, utg., 1991); så vel som oppdaterte eller reviderte utgivelser av alle av de foregående.

Som benyttet her, refererer betegnelsen "glutenase" til et enzym nyttig i fremgangsmåtene av den foreliggende oppfinnelsen som er i stand til, alene eller i kombinasjon med endogen eller eksogent tilsatte enzymer, å kløyve toksiske oligopeptider av gluten proteiner av hvete, bygg, havre og rug til ikke-toksiske fragmenter. Gluten er proteinfraksjonen i korndeig, som kan bli delt inn igjen til gluteniner og prolaminer, som er subklassifisert som gliadiner, sekaliner, hordeiner og aveniner fra henholdsvis hvete, rug, bygg og hvete. For videre diskusjon av glutenproteiner, se gjennomgåelsen ved Wieser (1996) *Acta Paediatr Suppl.* 412:3-9.

10 ENZYMER

Homology-basert identifisering (for eksempel, ved en PILEUP sekvensanalyse) av prolylendopeptidaser kan bli rutinemessig utført ved dem av dyktighet i fagfeltet ved å betrakte denne angivelsen for å identifisere PEP'er egnet for anvendelse i fremgangsmåtene av den foreliggende oppfinnelsen. PEP'er produsert i mikroorganismer, planter og dyr. PEP'er tilhører serinproteasesuperfamilien av enzymer og har en konservert katalytisk triade bestående av Ser, His og Asp residuer. Noen av disse homologene har blitt karakterisert, for eksempel enzymene fra *F. meningosepticum*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas punctata*, *Novosphingobium capsulatum*, *Pyrococcus furiosus* og fra mammalske kilder er biokjemisk karakteriserte PEP'er. Andre slike som *Nostoc* og *Arabidopsis* enzymene er trolig PEP'er, men har ikke blitt fullstendig karakterisert enda. Homologer av enzymene av interesse kan bli funnet i offentlig tilgjengelige sekvensdatabaser, og fremgangsmåtene av oppfinnelsen inkluderer slike homologer. Kandidatenzymer er uttrykt ved å benytte standard heterologe ekspresjonsteknologier, og deres egenskaper er evaluert ved å benytte testene beskrevet her.

I en utførelsesform av oppfinnelsen er glutenasen *Flavobacterium meningosepticum* PEP (Genbank ID # D10980). Relativt til *F. meningosepticum* enzymet er den parvise sekvensidentiteten av denne familien av enzymer i 30-60% området. Følgelig inkluderer PEP'er enzymer som har > 30% identitet til *F. meningosepticum* enzymet (som i *Pyrococcus* enzymene), eller har > 40% identitet (som i *Novosphingobium* enzymene), eller som har > 50% identitet (som i *Aeromonas* enzymene) til *F. meningosepticum*

enzymet. Et utvalg av tester har verifisert den terapeutiske anvendelsen av denne PEP. *In vitro* har dette enzymet blitt vist å raskt kløyve flere toksiske glutenpeptider, som inkluderer den sterkt inflammatoriske 33-meren, (SEQ ID NO:12) LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF. *In vivo* virker den synergistisk med

5 peptidasene av den intestinale børstesømmembranen for å raskt detoksifisere disse peptidene, så vel som gluten som har blitt forbehandlet med gastriske og pankreatiske proteaser. Den har bred kjedengdespesifisitet, som gjør den spesielt godt egnet for nedbrytingen av lange prolin-rike peptider frigjort til tolvfingertarmen fra magen. Enzymet har et pH optimum omkring pH 7, og har høy spesifikk aktivitet under forhold

10 som etterligner den svakt sure omgivelsen av den øvre tynntarmen. *Flavobacterium* PEP kan kløyve alle T-cellepitoper i gluten som har blitt testet til nå. Den har spesiell preferanse for de immunodominante epitopene funnet i alfa-gliadin. Når gluten fra dagligvareforretning er behandlet med denne PEP, kan en rask reduksjon i dens antigenisitet bli observert, som bedømt ved LC-MS analyse og testing mot polyklonale

15 T-cellelinjer derivert fra tynntarmsbiopsier fra cøliakipasienter. Det denaturerte proteinet er ikke-allergent i gnagere, kaniner og mennesker. Det er relativt stabilt mot destruksjon ved pankreatiske proteaser, en viktig egenskap siden det under fysiologiske forhold vil være forventet å virke sammen med disse enzymene.

20 Et annet enzym av interesse er *Sphingomonas capsulata* PEP (Genbank ID# AB010298). Dette enzymet er sammenlignbart med *Flavobacterium* og *Myxococcus* enzymet. Det har bredere sekvensspesifisitet enn både *Flavobacterium* eller *Myxococcus* PEP, og kan derfor være i stand til å ødelegge den bredeste rekken av antigene epitoper. Lignende *Myxococcus* enzymet, er det også godt uttrykt i *E. coli*.

25

Et annet enzym av interesse er *Penicillium citrinum* PEP (Genbank ID# D25535). Dette enzymet har blitt vist til å ha PEP aktivitet basert på dets evne til å effektivt kløyve et antall av Pro-Xaa bindinger i peptider slik som dynorfin A og substans P. Den antatte metalloproteasen har fordelene av liten størrelse og en pH profil som gjør den

30 egnet til å arbeide sammen med de pankreatiske enzymene i tolvfingertarmen. På denne måten er den en god kandidat for behandlingen av cøliaki.

Et annet enzym av interesse er *Lactobacillus helveticus* PEP (Genbank ID# 321529).

Ulikt PEPene ovenfor, er denne PEP et sinkenzym. Den kan effektivt proteolysere lange peptidsubstrater slik som kaseinpeptidene YQEPVLGPVRGPFPIIV og RPKHPIKHQ.

Proteolyse foregår ved alle PV og PI subsetter, som antyder at PEPen foretrekker

5 hydrofobe residuer ved S1' posisjonen, som hyppig er funnet i gluten. Siden den

produserende stammen av *L. helveticus* CNRZ32 er alminnelig benyttet i

osteproduksjon, har dette enzymet ønskelige egenskaper som et enzym av matvaregrad.

Et annet enzym av interesse er *Myxococcus xanthus* PEP (Genbank ID# AF127082).

10 Dette enzymet har mange av fordelene til *Flavobacterium* PEP. Den kan kløyve

33-mer til små, ikke-toksiske peptider. Mens *Flavobacterium* enzymet viser seg å ha en

relativt streng preferanse for PQ bindinger i gliadinpeptider, kan *Myxococcus* enzymet

kløyve ved PQ, PY og PF bindinger, en egenskap som tillater den å proteolysere en rekke

av gluteneptoper. Sammenlignet med *Flavobacterium* enzymet, har den ekvivalent

15 stabilitet mot de pankreatiske proteasene og overlegen stabilitet mot sure omgivelser.

Myxococcus enzymet er godt uttrykt i *E. coli*, som gjør det enkelt å produsere dette enzymet billig.

Glutenaseenzymfragmenter av interesse inkluderer fragmenter av minst omkring 20

20 tilstøtende aminosyrer, mer vanlig minst omkring 50 tilstøtende aminosyrer, og kan

omfatte 100 eller flere aminosyrer, opp til det fullstendige proteinet, og kan strekke seg

videre til å omfatte ytterligere sekvenser. I hvert tilfelle er nøkkelkriteriet hvorvidt

fragmenter beholder evnen til å fordøye de toksiske oligopeptidene som bidrar til symptomene av cøliaki.

25

Modifikasjoner av interesse som ikke endrer primær sekvens inkluderer kjemisk

derivatisering av proteiner, som for eksempel inkluderer acylering, for eksempel lauryl,

stearyl, myrsityl, decyl *etc.* grupper, PEGylering, esterifisering eller amidering. Slike

modifikasjoner kan bli benyttet for å øke resistensen av enzymet mot proteolyse, for

30 eksempel ved festing av PEG sidekjeder eller laurylgrupper til overflatelysin. Også

inkludert er modifikasjoner av glykosylering, f.eks. dem laget ved å modifisere

glykosyleringsmønstrene av et protein under dets syntese og prosessering eller i

ytterligere prosesseringstrinn; for eksempel ved å eksponere proteinet for enzymer som påvirker glykosylering, slik som mammalske glykosylerende eller deglykosylerende enzymer. Også omsluttet er sekvenser som har fosforylerte aminosyreresiduer, for eksempel fosfotyrosin, fosfoserin eller fosfotreonin.

5

Aminosyresekvensen av en glutenase, for eksempel en naturlig forekommende glutenase, kan bli endret på ulike måter kjent i fagfeltet for å generere målrettede endringer i sekvens og ytterligere glutenaseenzymer nyttige i formuleringen og sammensetningene av oppfinnelsen. Slike varianter vil vanligvis være funksjonelt

10 konserverte varianter, som vanligvis er forskjellig i sekvens, fra det korresponderende naturlige proteinet eller moderprotein, men beholder fortsatt den ønskede biologiske aktiviteten. Varianter inkluderer også fragmente av en glutenase som beholder enzymatisk aktivitet. Ulike fremgangsmåter kjent i fagfeltet kan bli benyttet for å generere målrettede endringer, for eksempel fage display i kombinasjon med tilfeldige

15 og målrettede mutasjoner, introdusering av scanning mutasjoner og lignende.

En variant kan være vesentlig like en naturlig sekvens, dvs. at den er forskjellig ved minst en aminosyre, og kan være forskjellig ved minst to, men vanligvis ikke mer enn omkring ti aminosyrer (antall av forskjeller avhenger av størrelsen av den naturlige

20 sekvensen). Sekvensendringene kan være substitusjoner, innsettinger eller delesjoner. Scanning mutasjoner som systematisk introduserer alanin eller andre residuer, kan bli benyttet for å bestemme nøkkelaminosyrer. Konservative aminosyresubstitusjoner inkluderer vanligvis substitusjoner innenfor de følgende gruppene: (glycin, alanin); (valin, isoleucin, leucin); (aspartinsyre, glutaminsyre); (asparagin, glutamin); (serin,

25 treonin); (lysin, arginin); og (fenylalanin, tyrosin).

Ulike modifikasjoner kan bli gjort på enzymsekvensen. MX PEP har en lignende struktur som den fra muskel eller hjerne fra svin. Enzymet består av et katalytisk

30 tønneformet propellldomaine. Det katalytiske domainet er laget av N-terminale residuer 1-67 og C-terminale residuer 410-678; propellerdomainet inkluderer residuer 71-406. To lineære tråder dannet ved residuer 67-70 og 407-409 sammenføyde de to domainene

kovalent. Denne analysen av *M. xanthus* PEP er nyttig i designen av modifiserte enzymer. Vanligvis vil slike modifiserte enzymer beholde den katalytiske triaden (Ser 533, Asp 616 og His 651) så vel som de konserverte Arg 618 residuene, hvor alle er forventet til å være viktig for aktivitet. Residuer Asn534, Tyr453 og Arg618 er

5 konservert i prolylendopeptidasefamilien, og slike residuer kan også være konservert i designen av modifiserte enzymer. I en utførelsesform er den utvidede regionen av propellområdet erstattet med en kort fleksibel linker som for eksempel omfatter 5-10 Gly residuer, som derved avkorter proteinet og reduserer dets proteolytiske mottagelighet for pepsin.

10

For eksempel har mutasjoner blitt laget med V458 og G532, som er nær den katalytiske Ser533 i bindingslommen. Deres mutanter beholder vill-type aktivitet mot Suc-Ala-Pro-pNA, men viser redusert aktivitet mot 13-meren. Andre mutanter, R572A/Q, I575A og F229Y har en økt spesifisitet for et lenger substrat.

15

Enzymer modifisert for å tilveiebringe en spesifikk egenskap av interesse kan bli ytterligere modifisert, for eksempel ved mutagenese, exon shuffling etc., som kjent i fagfeltet, etterfulgt ved screening eller seleksjon, for å optimalisere eller gjenopprette aktiviteten av enzymet, for eksempel til vill-type nivåer.

20

Også nyttige i praktiseringen av den foreliggende oppfinnelsen er proteiner som har blitt modifisert ved å benytte molekylærbiologiske teknikker og/eller kjemi for å forbedre deres motstandsdyktighet mot proteolytisk degradering og/eller for sure omgivelser slik som den funnet i magen, og for å optimalisere løselighetsegenskaper eller for å gjøre

25 dem mer egnet som et terapeutisk middel. Ryggraden av peptidasen kan for eksempel bli cyclisert for å forsterke stabilitet (se Friedler *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* **275**:23783-23789). Analoger av slike proteiner inkluderer dem som inneholder residuer andre enn de naturlige forekommende L-aminosyrene, for eksempel D-aminosyrer eller ikke-naturlig forekommende syntetiske aminosyrer.

30

Glutenaseproteinene nyttige i praktiseringen av den foreliggende oppfinnelsen kan også bli isolert og renses i overensstemmelse med konvensjonelle fremgangsmåter fra

rekombinante produksjonssystemer og fra naturlige kilder. Proteaseproduksjon kan bli oppnådd ved å benyttet etablerte vert-vektorsystemer i organismer slik som *E. coli*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *Lactobacilli*, *Bacilli* og *Aspergilli*. Integrerende eller selv-replikerende vektorer kan bli benyttet for dette formålet. I noen av disse vertene er

5 proteasen uttrykt som et intracellulært protein og deretter renses, imens de andre verter er enzymet skilt ut til det ekstracellulære mediumet. Rensing av proteinet kan bli utført ved en kombinasjon av ionebytterkromatografi, Ni-affinitetskromatografi (eller noen alternativ kromatografisk prosedyre), hydrofob interaksjonskromatografi og/eller andre renseteknikker. Vanligvis vil sammensetningene benyttet i praktiserigen av

10 oppfinnelsen omfatte minst 20% ved vekt av det ønskede produktet, mer vanlig minst omkring 50% ved vekt, fortrinsvis minst omkring 85% ved vekt, minst omkring 90%, og for terapeutiske formål kanskje minst omkring 95% ved vekt, i forhold til kontaminanter relatert til fremgangsmåten av fremstilling av produktet og dets rensing. Vanligvis vil prosentandelene være basert på totalprotein. Proteiner i slike sammen-

15 setninger kan være tilstede ved en konsentrasjon på minst omkring 500 µg/ml; minst omkring 1 mg/mg; minst omkring 5 mg/ml; minst omkring 10 mg/ml eller mer.

Det er også beskrevet et rensespreparat av en glutenase. Slike enzymer kan bli produsert ved rekombinante fremgangsmåter. I en utførelsesform benytter slike

20 fremgangsmåter en bakteriell vert for ekspresjon, selv om sopp og eukaryote systemer finner anvendelse for noen formål. Kodende sekvenser som inneholder en signalsekvens eller som er konstruert til å inneholde en signalsekvens, kan bli skilt ut til det periplasmiske rommet av en bakteriell vert. En osmotisk sjokkprotokoll kan så bli benyttet for å frigjøre de periplasmiske proteinene til supernatant.

25

Hvor enzymet er et cytoplasmisk enzym, kan en signalsekvens bli introdusert for periplasmisk sekresjon, eller enzymet kan bli isolert fra et cytoplasmisk lysat. Fremgangsmåter for rensing inkluderer Ni-NTA affinitetsrensing, for eksempel i kombinasjon med introduksjon av et histidinmerke; og kromatografiske fremgangsmåter

30 kjent i fagfeltet, for eksempel ionebytter, anionbytter, gelfiltrering, HPLC, FPLC og lignende.

For ulike formål, slik som stabil lagring, kan enzymet bli lyofilisert. Lyofilisering er fortrinnsvis utført på et til å begynne med konsentrert preparat, for eksempel av minst omkring 1 mg/ml. Peg kan bli tilsatt for å forbedre enzymstabilitet. Det har blitt funnet at MX PEP kan bli lyofilisert uten tap av spesifikk aktivitet. Det lyofiliserte enzymet og
5 bindemidlene er nyttige i produksjonen av enterisk-belagte kapsler eller tabletter, for eksempel kan en enkel kapsel eller tablett inneholde minst omkring 1 mg PEP, vanligvis minst omkring 10 mg PEP, og kan inneholde minst 100 mg PEP, minst omkring 500 mg PEP eller mer. Som beskrevet i detalj her, kan enteriske belegg bli benyttet, hvor en vesentlig fraksjon av aktiviteten er beholdt, og er stabil i minst omkring 1 måned ved
10 4°C. Det har også blitt funnet at MX PEP beholder aktivitet i en tablettformulering.

Før den foreliggende oppfinnelsen, var det ingen merkbare behov for en glutenase som kan bli inntatt ved et menneske eller blandet med en matvare. Før den foreliggende oppfinnelsen eksisterte de fleste glutenaser ikke i en form fri for kontaminanter som kan
15 være skadelige for et menneske om inntatt. Den foreliggende oppfinnelsen skaper et behov for slike glutenasepreparater og tilveiebringer dem og fremgangsmåter for å preparere dem. Det beskrives nye matvarer som er derivert fra gluteninnholdende matvarer, men har blitt behandlet for å redusere konsentrasjonen og mengden av ligopeptidene og oligopeptidsekvensene oppdaget for å være toksiske for
20 cøliakipasienter. Mens glutenfrie matvarer eller matvarer med redusert gluten har blitt laget, er matvarene for anvendelse i foreliggende oppfinnelse ikke bare forskjellig fra slike matvarer ved måten de er fremstilt på, ved behandling av matvarene med en glutenase, mens også ved deres innhold, ettersom fremgangsmåtene av det tidligere fagfeltet resulterte i endringer av ikke-toksiske (for cøliakipasienteer) sammensetninger
25 av matvaren, som resulterer i en forskjellig smak og sammensetning. Tidligere matvarer fra fagfeltet inkluderer for eksempel Codex Alimentarius hvetestivelse, som er tilgjengelig i Europa og har <100 ppm gluten. Denne stivelsen er vanligvis fremstilt ved fremgangsmåter som benytter fordelene av det faktum at gluten er uløselig i vann, mens stivelse er løselig.

30

I en utførelsesform refererer betegnelsen "glutenase" som benyttet her til et protease eller et peptidaseenzym som møter en eller flere av kriteriene tilveiebrakt her. Slike

kriterier finner også anvendelse i evalueringen av enzymmodifikasjoner, for eksempel som et screeningsverktøy etter genering av modifikasjon. I noen utførelsesform er modifikasjoner til MX PEP aminosyresekvensen eller ikke-peptidmodifikasjoner bestemt ved å benytte slike tester. Ved å benytte disse kriteriene, kan en av dyktighet i fagfeltet bestemme egnetheten av et kandidatenzym eller enzymmodifikasjon for anvendelse i fremgangsmåtene av oppfinnelsen. Mange enzymer vil møte multiple kriterier som inkluderer to, tre, fire eller flere av kriteriene, og noen enzymer vil møte alle kriteriene. Betegnelse "protease" eller "peptidase" kan referere til en glutenase, og som benyttet her, beskriver et protein eller fragment derav med evnen til å kløyve peptidbindinger, hvor den spaltede peptidbindingen enten kan være terminalt eller innvendig i oligopeptider eller større proteiner. Prolyl-spesifikke peptidaser er glutenaser nyttige i praktiseringen av den foreliggende oppfinnelsen.

Glutenaser inkluderer protease og peptidaseenzymer som har minst omkring 20% sekvensidentitet ved aminosyrenivået, mer vanlig minst omkring 40% sekvensidentitet, og fortrinnsvis minst omkring 70% sekvensidentitet til en av de følgende peptidasene: prolylendopeptidase (PEP) fra *F. meningosepticum* (Genbank adgangsnummer D10980), PEP fra *A. hydrophila* (Genbank adgangsnummer D14005), PEP fra *S. capsulata* (Genbank adgangsnummer AB010298), DCP I fra kanin (Genbank adgangsnummer X62551), DPP IV fra *Aspergillus fumigatus* (Genbank adgangsnummer U87950), karboksypeptidase fra *Aspergillus saitoi* (GenBank ID# D25288), PEP fra *Lactobacillus helveticus* (Genbank ID# 321529) eller cysteinproteinase B fra *Hordeum vulgare* (Genbank adgangsnummer JQ1110).

Hver av proteasene beskrevet her ovenfor kan bli konstruert for å forbedre ønskede egenskaper slik som forsterket spesifisitet mot toksiske gliadinsekvenser, forbedret toleranse for lengere substrater, syrestabilitet, pepsinresistens, resistens for proteolyse ved pankreatiske enzymer og forbedret lagringstid. Den ønskede egenskapen kan bli konstruert via standard fremgangsmåter for proteinmanipulering.

30

Andre enn prolin, glutaminresiduer er også sterkt herskende i glutenproteiner. Toksisiteten av gluten i cøliaki har blitt direkte korrelert til nærværet av spesifikke Gln

residuer. Glutamin-spesifikke proteaser er derfor også fordelaktige for behandlingen av cøliaki. Siden havrer inneholder proteiner som er rike i glutamin, men ikke spesielt rike i prolinresiduer, er en ytterligere fordel av en glutamin-spesifikk protease forbedringen av hvetetoleranse hos de cøliakipasientene som viser mild havreintoleranse. Et

5 eksempel på en slik protease er den ovenfor nevnte cysteinendoproteinase fra gluten. Dette enzymet kløyver glutenproteiner raskt med en distinkt preferanse for post-Gln kløyving. Også av interesse er *Hordeum vulgare* endoprotease (Genbank adgangsnummer U19384), som har blitt vist til å effektivt fordøye α 2-gliadin. Enzymet er aktivt under sure forhold, og er nyttig som et oralt administrert ernæringsmessig supplement.

10 En gluteninnholdende diett kan bli supplementert med oralt administrert proEPB2, som resulterer i effektiv degradering av immunogene glutenpeptider i den sure magen, før disse peptidene går inn i tarmen og er presentert for immunsystemet. Proteiner med høy sekvenslikhet til dette enzymet er også av interesse. En fordel av disse enzymene er at de er betraktet som trygge for humant oralt forbruk på grunn av deres tilstedeværelse i

15 ernæringsmessig gluten fra bygg.

Intestinal dipeptidylpeptidase IV og dipeptidylkarboksypeptidase I er de hastighetsbegrensende enzymene i nedbrytingen av toksiske gliadinpeptider fra gluten. Disse enzymene er flaskehalsen i glutenfordøying hos tynntarmen i pattedyr fordi (i) deres

20 spesifikke aktivitet er relativt lav sammenlignet med andre amino- og karboksypeptidaser i tarmen børstesøm; og (ii) på grunn av deres sterke sensitivitet for substratkjedelengde, kløyver de lange immunotoksiske peptider slik som 33-meren ekstremt sakt. Begge disse problemene kan bli forbedret gjennom administrasjonen av prolin-spesifikke amino- og karboksypeptidaser fra andre kilder. For eksempel kan X-Pro

25 dipeptidasen fra *Aspergillus oryzae* (GenBank ID# BD191984) og karboksypeptidasen fra *Aspergillus saitoi* (GenBank ID# D25288) kan forbedre glutenfordøying hos tarm med cøliaki.

En glutenase inkluderer en peptidase eller protease som har en spesifikk aktivitet på

30 minst 2,5 U/mg, fortrinnsvis 25 U/mg og mer foretrukket 250 U/mg for kløyving av et peptid som omfatter et eller flere av de følgende motivene:

Gly-Pro-pNA, Z-Gly-Pro-pNA (hvor Z er en benzyloksykarbonylgruppe), og Hip-His-Leu, hvor "Hip" er hippurinsyre, pNA er para-nitroanilid, og 1 U er mengden av enzym nødvendig for å katalysere omsetningen av 1 μmol substrat pr. minuty. Kromogene substrater kan bli benyttet i screening, for eksempel muliggjør substrater slik som Cbz-Gly-Pro-pNA eller Suc-Ala-Pro-pNA identifisering av prolinspesifikke proteaser. Lignende substrater kan også bli benyttet for å identifisere glutaminspesifikke proteaser. Disse testene kan bli monitorert ved UV-Vis spektrofotometriske fremgangsmåter.

En glutenase inkluderer et enzym som tilhører enhver av de følgende enzymklassifiseringene: EC 3.4.21.26, EC 3.4.14.5 eller EC 3.4.15.1.

En glutenase inkluderer et enzym som har en $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ på minst omkring $2,5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, vanligvis minst omkring $250 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ og fortrinnsvis minst omkring $25000 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ for kløyving av enhver av de følgende peptidene, som inkluderer kjente T-celle epitoper i gluten, under optimale forhold: (SEQ ID NO:1) QLQPFPPQQLPY eller PFPQPQLPY, (SEQ ID NO:3) PQPQLPYPQPQLPY eller PQPQLPYPQ, (SEQ ID NO:13) QPQQSFPQQQ eller PQQSFPQQQ, (SEQ ID NO:14) QLQPFPPQPELPY, (SEQ ID NO:15) PQPELPYPQPELPY, (SEQ ID NO:16) QPQQSFPEQQ; (SEQ ID NO: 30) IQPQQPAQL; (SEQ ID NO:31) QQPQQPYYPQ; (SEQ ID NO:32) SQPQQQFPQ; (SEQ ID NO:33) QQPFPQQPQ; eller (SEQ ID NO:34) PFSQQQQPV. Kløyving av lengere, fysiologisk genererte peptider inneholdende en eller flere av epitopene ovenfor kan også bli bestemt, for eksempel kløyving av 33-meren fra alfa-gliadin, (SEQ ID NO:12) LQLQPF(PQPQLPY)₃PQPQPF, og 26-meren fra gamma-gliadin, (SEQ ID NO:35) FLQPQQPFPQQPQQPYYPQQPQQPFPQ. En glutenase av oppfinnelsen inkluderer peptidase eller protease som har en spesifisitet $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} > 2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for det quenchede fluorogene substratet (SEQ ID NO:36) Abz-QPQQP-Tyr(NO₂)-D. Disse testene kan bli monitorert ved HPLC eller fluorescensspektro skopi. For de sistnevnte testene kan egnede fluoroforer bli festet til amino- og karboksy-endene av peptidene.

En glutenase nyttig i praktiseringen av den foreliggende oppfinnelsen kan bli identifisert ved dens evne til å kløyve et forbehandlet substrat for å fjerne toksiske glutenoligo-peptider, hvor et "forbehandlet substrat" er et gliadin-, hordein-, sekalin- eller avenin-

protein som har blitt behandlet med fysiologiske mengder av gastriske og pankreatiske proteaser, som inkluderer pepsin (1:100 masseforhold), trypsin (1:100), chymotrypsin (1:100), elastase (1:500) og karboksypeptidaser A og B (1:100). Pepsinfordøyning kan bli utført ved pH 2 i 20 min., for å etterligne gastrisk fordøyning, etterfulgt ved

5 ytterligere behandling av reaksjonsblandingen med trypsin, chymotrypsin, elastase og karboksypeptidase ved pH 7 i 1 time, for å etterligne tolvfingertarmfordøyning ved utskilte pankreatiske enzymer. Det forbehandlede substratet omfatter oligopeptider resistente for fordøyning, for eksempel under fysiologiske forhold. En glutenase kan katalysere kløyving av pepsin-trypsin-chymotrypsin-elastase-karboksypeptidase

10 (PTCEC) behandlet gluten slik at mindre enn 10% av produktene er lenger enn (SEQ ID NO:3, aa 1-9) PQQQLPYPQ (som bedømt ved lenger retensjonstider på en C18 revers fase HPLC kolonne monitorert ved A₂₁₅).

Evnen av en peptidase eller protease til å kløyve et forbehandlet substrat kan bli bestemt

15 ved å måle evnen av et enzym til å øke konsentrasjonen av frie NH₂-ender i en reaksjonsblanding inneholdende 1 mg/ml forbehandlet substrat og 10 µg/ml av peptidasen eller proteasen, inkubert ved 37°C i 1 time. En glutenase nyttig i praktiseringen av den foreliggende oppfinnelsen vil øke konsentrasjonen av de frie aminoendene under slike forhold, vanligvis ved minst omkring 25%, mer vanlig ved

20 minst omkring 50%, og fortrinnsvis ved minst omkring 100%. En glutenase inkluderer et enzym i stand til å redusere den molare restkonsentrasjonen av oligopeptider større enn omkring 1000 Da i et 1 mg/ml "forbehandlet substrat" etter en 1 time inkubasjon med 10 µg/ml av enzymet ved minst omkring 2 ganger, vanligvis ved minst omkring 5

25 ganger, og fortrinnsvis ved minst omkring 10 ganger. Konsentrasjonen av slike oligopeptider kan bli estimert ved fremgangsmåter kjent i fagfeltet, for eksempel størrelses-ekslusjonsskromatografi og lignende.

En glutenase inkluderer et enzym i stand til å detoksifisere helt gluten, som monitorert ved polyklonale T-cellelinjer derivert fra tarmbiopsier av cøliaki-pasienter;

30 detoksifisering av helt gluten som monitorert ved LC-MS-MS; og/eller detoksifisering av helt gluten som monitorert ved ELISA tester ved å benytte monoklonale antistoffer i stand til å gjenkjenne sekvenser spesifikke til gliadin.

For eksempel kan en glutenase redusere kraften ved hvilken et “forbehandlet substrat” kan antagonisere binding av (SEQ ID NO:17) PQPELPYPQPQLP til HLA-DQ2. Evnen av et substrat til å binde til HLA-DQ er indikerende for dens toksisitet; fragmenter

5 mindre enn omkring 8 aminosyrer er generelt ikke stabilt bundet til Klasse II MHC. Behandling med en glutenase som fordøyer toksiske oligopeptider, ved å redusere konsentrasjonen av de toksiske oligopeptidene, hindrer en blanding inneholdende dem fra å konkurrere med et testpeptid for MHC binding. For å teste hvorvidt en kandidat

10 glutenase kan bli benyttet for formål av den foreliggende oppfinnelsen, kan en 1 mg/ml løsning av “forbehandlet substrat” først bli inkubert med 10 µg/ml av kandidat-glutenasen, og evnen av den resulterende løsning til å fortrenge radioaktiv (SEQ ID NO:18) PQPELPYPQPQLP på forhånd bundet til HLA-DQ2 molekyler, kan så bli kvantifisert, med en reduksjon av fortrenkning, relativt til en ubehandlet kontroll, indikativ for utnyttelse i fremgangsmåtene av den foreliggende oppfinnelsen.

15 En glutenase inkluderer et enzym som reduserer anti-tTG antistoff- responsen til en “glutenutfordret diett” hos en cøliakipasient ved minst omkring 2 ganger, mer foretrukket ved minst omkring 5 ganger, og fortrinnsvis ved minst omkring 10 ganger. En “glutenutfordrende diett” er definert som inntaket av 100 g brød pr. dag i 3 dager

20 ved en voksen cøliakipasient som tidligere var på en glutenfri diett. Anti-tTG antistoffresponsen kan bli målt i periferisk blod ved å benytte standard kliniske diagnostiske prosedyrer, som kjent i fagfeltet.

Ekskludert fra betegnelsen “glutenase” er de følgende peptidasene: human pepsin,

25 human trypsin, human chymotrypsin, human elastase, papaya papain og ananas bromelain, og vanligvis ekskludert er enzymer som har mer enn 98% sekvensidentitet ved aminosyrenivået til slike peptidaser, mer vanlig ekskludert er enzymer som har mer enn 90% sekvensidentitet ved aminosyrenivået til slike peptidaser, og fortrinnsvis ekskludert er enzymer som har mer enn 70% sekvensidentitet ved aminosyrenivået til

30 slike peptidaser.

Blant glutenproteiner med potensiell skadelig effekt for cøliakipasienter er inkludert lagringsproteinene av hvete, arter som inkluderer *Triticum aestivum*; *Triticum aethiopicum*; *Triticum baeoticum*; *Triticum militinae*; *Triticum monococcum*; *Triticum sinskajae*; *Triticum timopheevii*; *Triticum turgidum*; *Triticum urartu*, *Triticum vavilovii*;
 5 *Triticum zhukovskiyi*; etc. En gjennomgåelse av genene som koder for hvete lagringsproteiner kan bli funnet i Colot (1990) Genet Eng (N Y) 12:225-41. Gliadin er den alkoholløselige proteinfraksjonen av hvetegluten. Gliadiner er vanligvis rike i glutamin og prolin, spesielt i den N-terminale delen. For eksempel inneholder de første 100 aminosyrene av α - og γ -gliadiner ~35% og ~20% av henholdsvis glutamin og prolin-
 10 residuer. Mange hvetegliadiner har blitt karakterisert, og ettersom det er mange stammer av hvete og andre kornsorter, er det antatt at mange flere sekvenser vil bli identifisert ved å benytte rutinemessige fremgangsmåter av molekylær biologi. I et aspekt av den foreliggende beskrivelsen er genetisk modifiserte planter tilveiebrakt som er forskjellig fra deres naturlig forekommende motparter ved å ha gliadinproteiner som inneholder et
 15 redusert innhold av glutamin og prolinresiduer.

Eksempler på gliadinsekvenser inkluderer, men er ikke begrenset til hvete alfa gliadin sekvenser, for eksempel som tilveiebrakt i Genbank, adgangsnumre AJ133612; AJ133611; AJ133610; AJ133609; AJ133608; AJ133607; AJ133606; AJ133605;
 20 AJ133604; AJ133603; AJ133602; D84341.1; U51307; U51306; U51304; U51303; U50984; og U08287. En sekvens av hvete omega gliadin er presentert i Genbank adgangsnummer AF280605.

For formålene av den foreliggende oppfinnelsen er toksiske gliadinoligopeptider
 25 peptider derivert under normal human fordøying av gliadiner og relaterte lagringsproteiner som beskrevet ovenfor, fra ernæringsmessige kornsorter, for eksempel hvete, rug, bygg og lignende. Slike oligopeptider er trodd til å tjene som antigener for T-celler i cøliaki. For binding til klasse II MHC proteiner, er immunogene peptider vanligvis fra omkring 8 til 20 aminosyrer i lengde, mer vanlig fra omkring 10 til 18 aminosyrer. Slike
 30 peptider kan inkludere PXP motiver, slik som motivet PQQQLP (SEQ ID NO:8). Bestemmelse av hvorvidt et oligopeptid er immunogent for en bestemt pasient er enkelt

bestemt ved standard T-celleaktivering og andre tester kjent for dem av dyktighet i fagfeltet.

Som demonstrert her, under fordøying, vedblir peptidaseresistente oligopeptider etter eksponering av glutener, for eksempel gliadin, for normale fordøyelsesenzymmer.

Eksempler på peptidaseresistente oligopeptider er tilveiebrakt, for eksempel, som presentert i SEQ ID NO:5, 6, 7 og 10. Andre eksempler på immunogene gliadinoligo-peptider er beskrevet i Wieser (1995) *Baillieres Clin Gastroenterol* 9(2):191-207.

10 Bestemmelse av hvorvidt et kandidatenzym vil fordøye et toksisk glutenoligopeptid, som diskutert ovenfor, kan bli empirisk bestemt. For eksempel kan en kandidat bli kombinert med et oligopeptid som omfatter et eller flere Gly-Pro-pNA, Z-Gly-Pro-pNA, Hip-His-Leu, Abz-QLP-Tyr(NO₂)-PQ, Abz-PYPQPQ-Tyr(NO₂), PQP-Lys(Abz)-LP-Tyr(NO₂)-PQPQLP, PQPQLP-Tyr(NO₂)-PQP-Lys(Abz)-LP motiver; med et eller
15 flere av oligopeptidene (SEQ ID NO:1) QLQPFQPQLPY, (SEQ ID NO:3) PQPQLPYPQPQLPY, (SEQ ID NO:13) QPQQSFQQQ, (SEQ ID NO:14) QLQPFQPQLPY, (SEQ ID NO:15) PQPELPYPQPELPY, (SEQ ID NO:16) QPQQSFPEQQ eller (SEQ ID NO:12) LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF; eller med et forbehandlet substrat
20 omfattende et eller flere av liadin, hordein, secalin eller aveninproteiner som har blitt behandlet med fysiologiske mengder av gastriske og pankreatiske proteaser. For eksempel er kandidaten bestemt til å være en glutenase av oppfinnelse om den er i stand til å kløyve oligopeptidet. Glutenaser som har en lav toksisitet for humane celler og er aktive i de fysiologiske forholdene tilstede i børstesømmen av tarmen er foretrukket for
25 anvendelse i noen anvendelsesområder av oppfinnelsen, og det kan derfor være nyttig å screene for slike egenskaper i kandidatglutenaser.

Oligopeptidet eller proteinsubstratene for slik tester kan bli preparert i overensstemmelse med konvensjonelle teknikker, slik som syntese, rekombinante
30 teknikker, isolering fra naturlige kilder eller lignende. For eksempel involverer fast-fase peptidsyntese den suksessive tilføyingen av aminosyrer for å lage en lineær peptidkjede

(se Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. **85**:2149-2154). Rekombinant DNA teknologi kan også bli benyttet for å produsere peptidet.

Nivået av fordøying av det toksiske oligopeptidet kan bli sammenlignet med en grunnlinje verdi. Forsvinningen av utgangsmaterialet og/eller nærværet av fordøyningsprodukter kan bli monitorert ved konvensjonelle fremgangsmåter. En detekterbar markør kan for eksempel bli konjugert til et peptid, og endringen i molekylær vekt assosiert med markøren er så bestemt, for eksempel syreprecipitering, molekylær vektutelukkelse og lignende. Grunnlinje verdien kan være en verdi for en kontrollprøve eller en statistisk verdi som er representativ for en kontrollpopulasjon. Ulike kontroller kan bli utført for å sikre at en observert aktivitet er autentisk, som inkluderer å kjøre parallelle reaksjoner, positive og negative kontroller, doserespons og lignende.

Aktive glutenaser identifisert ved fremgangsmåtene for screening beskrevet her kan tjene som ledende forbindelser for syntesen av analoge forbindelser for å identifisere glutenaser med forbedrede egenskaper. Identifisering av analoge forbindelser kan bli utført gjennom anvendelse av teknikker slik som selv-konsekvent felt (SCF) analyse, konfigurasjonsinteraksjon (CI) analyse og normal måte for dynamikkanalyse.

En ønsket egenskap i glutenaser er stabilitet mot gastriske (lav pH og pepsin) forhold. Glutenaser med forsterket gastrisk stabilitet kan bli identifisert ved mutagenese, etterfulgt ved kolonioverføring til væskeskultur i screeningsformater av høy gjennomstrømming slik som 96-brønners plater. Etter vekst kan en fraksjon av cellekulturen bli lysert og lysatet inkubert i ulike varigheter under simulerte gastriske forhold (pepsin, pH 2). Deretter kan lysatet bli testet med et egnet kromogent substrat (for eksempel Cbz-Succinyl-Ala-Pro-pNA). En intens gul farge vil utvikle seg i nærværet av ekstrakter med forsterket gastrisk stabilitet.

FORMULERINGER

30

I en utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er en cøliakipasient, i tillegg til å bli gitt en glutenase eller mat behandlet i overensstemmelse med de foreliggende

fremgangsmåtene, gitt en inhibitor av vevstransglutaminase, et anti-inflammatorisk middel, et middel mot magesår, mastcelle stabiliserende midler og/eller et anti-allergimiddel. Eksempler på slike midler inkluderer HMG-CoA reduktaseinhibitorer med anti-inflammatoriske egenskaper slik som kompaktin, lovastatin, simvastatin, pravastatin og atorvastatin; anti-allergiske histamin H1 reseptorantagonister slik som akrivastin, cetirizin, desloratadin, ebastin, feksofenadin, levocetirizin, loratadin og mizolastin; leukotrienreseptorantagonister slik som montelukast og zafirlukast; COX2 inhibitorer slik som celecoksib og rofecoksib; p38 MAP kinaseinhibitorer slik som BIRB-796; og mastcellestabiliserende midler slik som natriumkromglykat (kromolyn), pemirolast, proksikromil, repirinast, doksantrazol, amleksanoksnedokromil og probikromil.

Som benyttet her, kan forbindelser som er "kommersielt tilgjengelige" bli oppnådd fra kommersielle kilder som inkluderer, men er ikke begrenset til, Acros Organics (Pittsburgh PA), Aldrich Chemical (Milwaukee WI, inkludert Sigma Chemical and Fluka), Apin Chemicals Ltd. (Milton Park UK), Avocado Research (Lancashire U.K.), BDH Inc. (Toronto, Canada), Bionet (Cornwall, U.K.), Chemservice Inc. (West Chester PA), Crescent Chemical Co. (Hauppauge NY), Eastman Organic Chemicals, Eastman Kodak Company (Rochester NY), Fisher Scientific Co. (Pittsburgh PA), Fisons Chemicals (Leicestershire UK), Frontier Scientific (Logan UT), ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa CA), Key Organics (Cornwall U.K.), Lancaster Synthesis (Windham NH), Maybridge Chemical Co. Ltd. (Cornwall U.K.), Parish Chemical Co. (Orem UT), Pfaltz & Bauer, Inc. (Waterbury CN), Polyorganix (Houston TX), Pierce Chemical Co. (Rockford IL), Riedel de Haen AG (Hannover, Germany), Spectrum Quality Product, Inc. (New Brunswick, NJ), TCI America (Portland OR), Trans World Chemicals, Inc. (Rockville MD), Wako Chemicals USA, Inc. (Richmond VA), Novabiochem and Argonaut Technology.

Forbindelser nyttige for ko-administrasjon med glutenasene og behandlede matvarer av oppfinnelsen kan også bli laget ved fremgangsmåter kjent for en av ordinær dyktighet i fagfeltet. Som benyttet her, kan "fremgangsmåter kjent for en av ordinær dyktighet i fagfeltet" bli identifisert gjennom ulike referansebøker og databaser. Egnede referansebøker og avhandlinger som detaljert beskriver syntesen av reaktanter nyttige i prepareringen av forbindelser av den foreliggende oppfinnelsen, eller tilveiebringer referanser til

artikler som beskriver prepareringen, inkluderer for eksempel, "Synthetic Organic Chemistry", John Wiley & Sons, Inc., New York; S. R. Sandler et al., "Organic Functional Group Preparations," 2. utg., Academic Press, New York, 1983; H. O. House, "Modern Synthetic Reactions", 2. utg., W. A. Benjamin, Inc. Menlo Park, Calif. 1972; T. L. 5 Gilchrist, "Heterocyclic Chemistry", 2. utg., John Wiley & Sons, New York, 1992; J. March, "Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure", 4. utg., Wiley-Interscience, New York, 1992. Spesifikke og analoge reaktanter kan også bli identifisert gjennom indeksene av kjente kjemikalier preparert ved Chemical Abstract Service of the American Chemical Society, som er tilgjengelig i de fleste offentlige og 10 univerisitetsbiblioteker, så vel som gjennom on-line databaser (the American Chemical Society, Washington, D.C., www.acs.org kan bli kontaktet for flere detaljer). Kjemikalier som er kjente, men ikke kommersielt tilgjengelige i kataloger, kan bli preparert ved steder for egendefinert kjemisk syntese, hvor mange av de standard kjemikalieleverandørene (for eksempel listet opp ovenfor) tilveiebringer egendefinert synteseservice.

15

Glutenaseproteinene og/eller forbindelse administrert dermed er inkorporert i et utvalg av formuleringer for terapeutisk administrasjon. I et aspekt er midlene formulert i farmasøytiske sammensetninger ved kombinasjon med hensiktsmessige, farmasøytisk akseptable bærere eller fortynningsmidler, og er formulert i preparater i faste, halvfaste, 20 flytende eller gassformer, slik som tablett, kapsler, pulvere, granuler, salver, løsninger, stikkpiller, injeksjoner, inhalanter, geleer, mikrosfærer og aerosoler. På denne måten kan administrasjon av glutenasen og/eller andre forbindelser bli oppnådd på ulike måter, vanligvis ved oral administrasjon. Glutenasen og/eller andre forbindelser kan være systemiske etter administrasjon eller kan være lokalisert i kraften av 25 formuleringen, eller ved anvendelsen av et implantat som virker for å beholde den aktive dosen ved stedet av implantering.

I farmasøytiske doseringsformer kan glutenase og/eller andre forbindelser bli administrert i formen deres farmasøytisk akseptable salter, eller de kan også bli benyttet 30 alene eller i hensiktsmessig assosiasjon, så vel som i kombinasjon med andre farmasøytisk aktive forbindelser. Midlene kan bli kombinert, som tidligere beskrevet,

for å tilveiebringe en cocktail av aktiviteter. De følgende fremgangsmåtene og bindemidlene er eksemplariske og skal ikke bli oppfattet til å begrense oppfinnelsen.

For orale preparater kan midlene bli benyttet alene eller i kombinasjon med

5 hensiktsmessige tilsetninger for å lage tabletter, pulvere, granuler eller kapsler, for eksempel, med konvensjonelle tilsetninger, slik som laktose, mannitol, maisstivelse eller potetstivelse; med bindemidler, slik som krystallinsk cellulose, cellulosederivater, acacia, maisstivelse eller gelatiner; med disintegrasjonsmidler, slik som maisstivelse, potetstivelse eller natriumkarboksymetylcellulose; med smøremidler, slik som talkum

10 eller magnesiumstearat; og om ønsket, med fortynningsmidler, bufrende midler, fuktemidler, konserveringsmidler og smaksmidler.

I en utførelsesform av oppfinnelsen omfatter de orale formuleringene enteriske belegg, slik at det aktive midlet er levert til fordøyelseskanalen. Et antall av fremgangsmåter er

15 tilgjengelig i fagfeltet for den effektive leveringen av enterisk belagte proteiner til lumen av tynntarmen. De fleste fremgangsmåter beror på proteinfrigjøring som et resultat av den plutselige økningen av pH når mat er frigjort fra magen til tolvfingertarmen, eller ved virkningen av pankreatiske proteaser som er skilt ut i tolvfingertarmen når mat går inn i tynntarmen. For intestinal levering av en PEP og/eller en glutamin-

20 spesifikk protease, er enzymet vanligvis lyofilisert i nærværet av hensiktsmessige buffere (for eksempel fosfat, histidin, imidazol) og bindemidler (for eksempel kryobeskyttelsesmidler slik som sukrose, laktose, trehalose). Lyofiliserte enzymkaker er blandet med bindemidler, så fylt i kapsler som er enterisk belagt med et polymert belegg som beskytter proteinet fra de sure omgivelsene av magen, så vel som fra virkning av

25 pepsin i magen. Alternativt kan proteinmikropartikler også bli belagt med et beskyttende lag. Eksemplariske filmer er celluloseacetatftalat, polyvinylacetatftalat, hydroksypropylmetylcelluloseftalat og hydroksypropylmetylcelluloseacetatsuccinat, metakrylat kopolymerer og celluloseacetateftalat.

30 Andre enteriske formuleringer omfatter konstruerte polymere mikrosfærer laget av biologisk nedbrytbare polymerer, som viser sterke adhesive interaksjoner med gastrointestinal mucus og cellulær beklødding og kan krysse både det mukosale

absorptive epiteliumet og det follikel-assosierte epiteliumet som dekker lymfoidevevet av Peyers lapper. Polymerene opprettholder kontakt med intestinalt epitelium for forlengede perioder av tid og penetrerer den, gjennom og mellom celler. Se, for eksempel, Mathiowitz *et al.* (1997) *Nature* 386 (6623): 410-414. Medikamentleverings-

5 systemer kan også benytte en kjerne av superporøse hydrogeler (SPH) og SPH kompositt (SPHC), som beskrevet av Dorkoosh *et al.* (2001) *J Control Release* 71(3):307-18.

Glutendetoksifisering for et glutensensitivt individ kan begynne så raskt som mat går inn i magen, siden de sure omgivelsene (~pH 2) av magen favoriserer glutenoppløsning. Introduksjon av en syre-stabil PEP eller glutamin-spesifikk protease i magen vil gi synergistisk effekt med virkningen av pepsin, som fører til akselerert destruksjon av toksiske peptider ved inngang av gluten i tynntarmene hos cøliakipasienter. I motset-

10 ning til en PEP som virker i tynntarmen, trenger gastriske enzymer ikke å være formulert med enteriske belegg. Flere proteaser (som inkluderer de ovenfor nevnte cysteinproteinase fra bygg) selv-aktiveres ved kløyving av de korresponderende pro-

15 proteinene under sure omgivelser. I en utførelsesform av oppfinnelsen omfatter formuleringen et pro-enzym som er aktivert i magesekken.

20 I en annen utførelsesform er en mikroorganisme, for eksempel bakterie- eller gjærkultur, i stand til å produsere glutenase, administrert til en pasient. En slik kultur kan bli formulert som en enterisk kapsel; se for eksempel United States Patent Nr. 6.008.027. Alternativt kan mikroorganismer stabile for magesekkenes surhet bli administrert i en kapsel, eller blandet med matpreparater.

25

I en annen utførelsesform er glutenasen blandet med mat, eller benyttet for å for-

behandle matvarer som inneholder glutener. Glutenase tilstede i matvarer kan være enzymatisk aktive før eller under inntak, og kan bli innkapslet eller på annen måte behandlet for å kontrollere timingen av aktivitet. Alternativt kan glutenasen bli

30 innkapslet for å oppnå en tilpasset frigjøring etter inntak, for eksempel i fordøyelseskanalen.

Formuleringer er vanligvis tilveiebrakt i en enhetsdoseringsform, hvor betegnelsen "enhetsdoseringsform" refererer til fysisk adskilte enheter egnet som enhetsdoseringer for humane individer, hvor hver enhet inneholder en forhåndsbestemt mengde av glutenase i en mengde kalkulert tilstrekkelig til å produsere den ønskede effekten i assosiasjon med et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel, en bærer eller et befordringsmiddel. Spesifikasjonene for enhetsdoseringsformene av den foreliggende oppfinnelsen avhenger av det bestemte komplekset benyttet og effekten som skal bli oppnådd, og farmakodynamikken assosiert med hvert kompleks i verten.

De farmasøytisk akseptable bindemidlene, slik som befordringsmidler, adjuvanter, bærere eller fortynningsmidler, er kommersielt tilgjengelige. Farmasøytisk akseptable hjelpesubstanser, slik som pH-justerende og bufrende midler, tonisitetsjusterende midler, stabilisatorer, fuktmidler og lignende, er videre kommersielt tilgjengelige. Enhver forbindelse nyttig i fremgangsmåtene og sammensetninger av oppfinnelse kan bli tilveiebrakt som et farmasøytisk akseptabelt basetilsetningssalt. "Farmasøytisk akseptabelt basetilsetningssalt" refererer til de saltene som beholder den biologiske effektiviteten og egenskapene av de frie syrene, som ikke er biologiske eller på annen måte uønsket. Disse saltene er fremstilt fra tilsetningen av en uorganisk base eller en organisk base til den frie syren. Salter derivert fra uorganiske baser inkluderer, men er ikke begrenset til, natrium, kalium, litium, ammonium, kalsium, magnesium, jern, sink, kobber, mangan, aluminumsalter og lignende. Foretrukne uorganiske salter er ammonium, natrium, kalium, kalsium og magnesiumsaltene. Salter derivert fra organiske baser inkluderer, men er ikke begrenset til, salter av primære, sekundære og tertiære aminer, substituerte aminer som inkluderer naturlig forekommende substituerte aminer, cycliske aminer og basiske ionebytterresiner, slik som isopropylamin, trimetylamin, dietylamin, trietylamine, tripropylamin, etanolamin, 2-dimetylaminoetanol, 2-dietylaminoetanol, dicykloheksylamin, lysin, arginin, histidin, kaffein, prokain, hydrabamin, cholin, betain, etylendiamin, glukosamin, metylglukamin, teobromin, puriner, piperazin, piperidin, N-etylpiiperidin, polyaminresiner og lignende. Spesielt foretrukne organiske baser er isopropylamin, dietylamin, etanolamin, trimetylamin, dicykloheksylamin, cholin og kaffein.

Avhengig av pasienten og tilstanden som skal bli behandlet og av administrasjonsruten, kan glutenasen bli administrert i doseringer på 0,01 mg til 500 mg/kg kroppsvekt pr. dag, for eksempel omkring 20 mg/dag for en gjennomsnittlig person. Effektiv proteolyse av gluten *in vivo* for en voksen kan kreve minst omkring 500 enheter av et terapeutisk virksomt enzym, vanligvis minst omkring 1000 enheter, mer vanlig minst omkring 2000 enheter, og ikke mer enn omkring 50.000 enheter, vanligvis ikke mer enn omkring 20.000 enheter, hvor en enhet er definert som mengden av enzym nødvendig for å hydrolysere 1 μmol Cbz-Gly-Pro-pNA (for PEP) eller Cbz-Gly-Gln-pNA (for en glutamin-spesifikk protease) pr. min under spesifiserte forhold. De fleste PEPer har spesifikke aktiviteter i området av 5-50 enheter/mg protein. Det vil bli forstått ved dem av dyktighet i fagfeltet at dosen kan bli økt, men at ytterligere fordeler ikke kan bli oppnådd ved å overskride den anvendelige doseringen. Doseringer vil bli hensiktsmessig justert for pediatrik formulering. Hos barn kan den effektive dosen være lavere, f.eks. minst omkring 0,1 mg eller 0,5 mg. I kombinasjonsterapi kan en sammenlignbar dose av de to enzymene bli gitt; imidlertid vil forholdet bli påvirket ved den relative stabiliteten av de to enzymene mot gastrisk og duodenal inaktivering.

Enzymbehandling av cøliaki er forventet til å være mest effektiv når administrert før eller med måltider. Siden mat kan oppholde seg i magesekken i 0,5-2 timer, og det primære stedet for virkning er forventet til å være i tynntarmen, kan imidlertid enzymet også bli administrert innenfor 1 time etter et måltid.

Optimal glutendetoksifisering *in vivo* kan også bli oppnådd ved å kombinere en hensiktsmessig gastrisk protease med en PEP som virker på glutenpeptider i tolvfingertarmen, sammen med pankreatiske enzymer. Dette kan bli oppnådd ved ko-administrasjon av to enzymdoser, for eksempel to kapsler/tabletter; via ko-formulering av de to enzymene i hensiktsmessige mengder; *etc.* Lyofiliserte duodenale PEP partikler eller granuler kan bli beskyttet ved et egnet polymert enterisk belegg som fremmer enzymfrigjøring bare i tolvfingertarmen. I motsetning vil frigjøring av den gastriske proteasen bli startet øyeblikkelig ved konsum av doseringsformen. Kombinasjonsbehandling som involverer en PEP og et komplementært terapeutisk middel, slik som en inhibitor av enzym vevstransglutaminasen, er også tilveiebrakt.

I noen utførelsesformer av oppfinnelsen omfatter formuleringer en cocktail av valgte proteaser. Slike kombinasjoner kan oppnå en større terapeutisk virkeevne. I en kombinasjonsformulering er *Flavobacterium* PEP og *Myxococcus* PEP ko-formulert eller ko-administrert for å tillate destruksjonen av en bredere rekke av glutenantigene peptider. På lignende måte kan kombinasjonsterapi med en eller to PEPer fra listen ovenfor med en syrestabil PEP eller glutaminendoprotease føre til mer effektiv glutenproteolyse i magesekken, som derved forenkler oppgaven av glutenassimilasjon i den øvre tynntarmen.

10

I en annen utførelsesform kombinerer formuleringen eller administrasjonsprotokollen et proteaseprodukt og en inhibitor av transglutaminase 2 (TG2). Slike formuleringer kan ha ytterligere beskyttelse fra glutenmediert enteropati, ettersom TG2 har blitt vist til å ha en signifikant pro-inflammatorisk effekt på glutenpeptider i tarm med cøliaki. Spesielt er TG2 inhibitorer som inneholder halo-dihydroisoksazol, diazometylketon eller dioksoindolhalvdeler nyttig for dette formålet.

I en annen utførelsesform er proteasen eller protease-cocktailen administrert og/eller formulert med et anti-inflammatorisk middel, for eksempel, et statin; p38 MAP kinase inhibitor; anti-TNF α -middel; osv.

Dem av dyktighet vil enkelt forstå at dosenivåer kan variere som en funksjon av det spesifikke enzymet, kraftigheten av symptomene og mottageligheten av individet for bieffekter. Noen av glutenasene er mer potente enn andre. Foretrukne doseringer for et gitt enzym kan enkelt bestemmes ved dem av dyktighet i fagfeltet ved et utvalg av midler. Et foretrukket middel er å måle den fysiologiske kraften av en gitt forbindelse.

Andre formuleringer av interesse inkluderer formuleringer av DNA som koder for glutenaser av interesse, for å målsøke tarmceller for genetiske modifikasjoner. Se for eksempel, U.S. patent nr. 6.258.789, som angir den genetiske endringen av tarmepitelceller.

30

TERAPEUTISKE FREMGANGSMÅTER

Fremgangsmåtene er benyttet for å behandle matvarer som skal bli konsumert eller som er konsumert ved individer som lider av cøliaki og/eller dermatitis herpetiformis ved å

5 levere en effektiv dose av glutenase. Om glutenasen er administrert direkte til et menneske, så finnes det aktive midlet/midlene i en farmasøytisk formulering. Alternativt kan de ønskede effektene bli oppnådd ved å inkorporere glutenase i matprodukter eller ved å administrere levende organismer som uttrykker glutenase og lignende. Diagnose av egnede pasienter kan benytte et utvalg av kriterier kjent for dem

10 av dyktighet i fagfeltet. En kvantitativ økning i antistoffer spesifikke for gliadin, og/eller vevstransglutaminase er indikative for sykdommen. Familiehistorier og nærværet av HLA allelene HLA-DQ2 [DQ(a1*0501, b1*02)] og/eller DQ8 [DQ(a1*0301, b1*0302)] er indikative for mottagelighet for sykdommen.

15 Den terapeutiske effekten kan bli målt på vilkår av klinisk resultat eller kan bli bestemt ved immunologiske eller biokjemiske tester. Undertrykking av den skadelige T-celleaktiviteten kan bli målt ved å telle opp reaktive Th1 celler, ved å kvantifisere frigjøringen av cytokiner ved stedet av skade, eller ved å benytte andre tester for tilstedeværelsen av autoimmune T-celler kjent i fagfeltet. Alternativt kan man se etter

20 en reduksjon i symptomer av en sykdom.

Ulike fremgangsmåter for administrasjon kan bli benyttet, fortrinnsvis ved å benytte oral administrasjon, for eksempel med måltider. Doseringen av den terapeutiske formuleringen vil variere bredt, avhengig av egenskapen av sykdommen, hyppigheten

25 av administrasjon, måten for administrasjon, forsvinningen av midlene fra verten og lignende. Den initielle dosen kan være større, etterfulgt ved mindre opprettholdende doser. Dosen kan bli administrert sjelden som ukentlig eller annen hver uke, eller oftere fraksjonert i mindre doser og administrert daglig, med måltider, hver halve uke, eller på annen måte som nødvendig for å opprettholde et effektivt doseringsnivå.

EKSEMPLER

De følgende eksemplene er presentert for å tilveiebringe dem av ordinær dyktighet i fagfeltet en fullstendig angivelse og beskrivelse for hvordan å lage og benytte den foreliggende oppfinnelsen, og er ikke ment til å begrense rekkevidden av oppfinnelsen eller til å representere at eksperimentene nedenfor er alle eller de eneste eksperimentene utført. Forsøk har blitt gjort for å sikre nøyaktighet med hensyn på numre benyttet (for eksempel mengder, temperatur og lignende), men noen eksperimentelle feil og avvik kan være tilstede. Med mindre enn indikert på annen måte, er deler deler ved vekt, molekylær vekt er gjennomsnittlig molekylær vekt, temperatur er i grader Centigrade, og trykk er ved eller nær atmosfærisk.

EKSEMPEL 1

Sammenligning av PEP aktiviteter

For å få innsikt i likheten og forskjellene mellom naturlig forekommende prolyl endopeptidaser, har vi systematisk sammenlignet egenskapene av tre homologe PEPer fra ulike bakterielle kilder. Våre studier har benyttet to kjente rekombinante PEPer fra *Flavobacterium meningosepticum* (FM) og *Sphingomonas capsulata* (SC), og en ny PEP fra *Myxococcus xanthus* (MX) som vi har uttrykt for første gang som et heterologt rekombinant protein. De enzymatiske aktivitetene av disse PEPene ble kvantitativt analysert kontra modellsubstrater så vel som to gluten-deriverte peptider med potensiell relevans til cøliaki patogenese. Spesielt har vi undersøkt innflytelsen av substratkjedefølgde pH, pankreatiske proteaser og intestinale børstesømpeptidaser på aktiviteten av hver PEP. Både in vivo og ex vivo eksperimenter ble utført som del av disse studiene.

Ekperimentelle prosedyrer

Kloning av PEP gener. PEP genene ble amplifisert fra det genomiske DNA fra de korresponderende bakterielle stammene (*F. meningosepticum*: ATCC 13253; *S. capsulata*: ATCC 14666; *M. xanthus*: ATCC 25232). Sekvensen av den antatte MX PEP er tilgjengelig fra NCBI databasen (Locus ID AAD31004). Oligonukleotider benyttet for PCR amplifisering inkluderte: (SEQ ID NO:1) (1) FM første halvdel: 5'-

AAC CAA TCA TAT GAA GTA CAA CAA ACT TTC TGT G (NdeI), (SEQ ID NO:2) 5'-GAT AAA AAC GGA AAG CTT GTA AGG GC (HindIII); FM andre halvdel: (SEQ ID NO:3) 5'-GCC CTT ACA AGC TTT CCG TTT TTA TC (HindIII) og (SEQ ID NO:4) 5'- CCC TTA ATT TTC AAA TTT TAG CTC GAG TTT ATG
 5 ATT TAT A (SacI); (2) SC første halvdel: (SEQ ID NO:5) 5'-AGG ATA TCC ATA TGA AGA ACC GCT TGT GG (NdeI), (SEQ ID NO:6) 5'- GAC AAC CTC GAA TCC GTC GGC ATT G (Hinfl); SC andre halvdel: (SEQ ID NO:7) 5'-CAA TGC CGA CGG ATT CGA GGT TGT C (Hinfl), (SEQ ID NO:8) 5'-CGC GGG GAC CTC GAG TAG AAA CTG (SacI); (3) MX: (SEQ ID NO:9) 5'-CT CCC CAT ATG TCC TAC
 10 CCG GCG ACC (NdeI) og (SEQ ID NO:10) 5' – GTG GCG GCG CAG GGC CGC AAG CTT CCC AAG CG (HindIII). De amplifiserte genene ble klonet inn i et pET28b plasmid (Novagen).

Ekspresjon og rensing av PEPer. Ekspresjonsplasmider ble introdusert via
 15 transformasjon inn i BL21(DE3) celler. Transformanter dyrket ved 37°C, og induert i nærværet av 100 µM IPTG ved 22°C over natt. Lav temperaturinduksjon ble funnet til å forbedre utbyttet av aktivt enzym. Alle rensetrinn ble utført ved 4°C med mindre enn på annen måte bemerket. Siden FM og SC PEP enzymer naturlig har en signalsekvens, er de skilt ut i det periplasmiske rommet av *E. coli*. En modifisert osmotisk sjokkprotokoll
 20 (EMD Biosciences, CA) ble derfor benyttet for å oppnå et anrikt proteinlysat inneholdende hver PEP. Cellepelletter (4 L av kultur) ble resuspendert i 30 ml av 30 mM Tris-HCl, pH 8, 20% sukrose og 1mM EDTA, og omrørt sakte ved romtemperatur i 10 min. Suspensjonen ble sentrifugert ved 10.000 g i 15 min, og cellepelletten ble resuspendert i iskald dH₂O og rørt sakte på is i 10 min. Cellene behandlet med sjokk ble så sentrifugert
 25 igjen ved 40.000-50.000 g i 30 min. Supernatanten inneholdende de periplasmiske proteinene ble behandlet i 1-2 timer med 1 M NaCl løsning (til en endelig konsentrasjon på 300 mM NaCl), 1 M imidazoløsning (til en sluttkonsentrasjon 5 mM imidazol) og 1 ml av Ni-NTA resin (Qiagen, CA). Råstoffproteinet ble så lastet på en kolonne inneholdende ytterligere 1 ml av Ni-NTA resin. Etter grundige vasketrinn ved å benytte
 30 vaskebufferen (50 mM fosfat, 300 mM NaCl, pH 7,0) med 0-10 mM imidazol, ble PEP eluert med 150 mM imidazol, 50 mM fosfat, 300 mM NaCl, pH 8. FM PEP ble ytterligere rensert på et FPLC system (Amersham Pharmacia, NJ) gjennom en HiTrap-

SP kationbytterkolonne. Før påføring til HiTrap-SP kolonnen, ble proteinet byttet over i 20 mM fosfatbuffer (pH 7). Etter injeksjon ble PEP eluert med en saltgradient fra 20 mM fosfat, pH 7 (buffer A) til 20 mM fosfat, 500 mM NaCl, pH 7 (buffer B) ved en strømningshastighet på 1 ml/min. MX PEP, et cytosolisk protein, ble først rensset fra et
 5 fullstendig cellelysat via Ni-NTA affinitetskromatografi (som detaljert beskrevet ovenfor). Proteinene ble ytterligere rensset på en Superdex 200 gelfiltreringskolonne (Amersham) med en isokratisk gradient på 20 mM HEPES, 2 mM DTT, pH 7,0 ved 1 ml/min.

10 *Aktivitetstester.* Post-prolinsklyvingsaktivitet ble målt ved å benytte Z-Gly-Pro-p-nitroanilid og Succinyl-Ala-Pro-p-nitroanilid (Bachem, CA). Z-Gly-Pro-pNA ble oppløst i en PBS:vann:dioksan (8:1,2:0,8) testblanding. Konsentrasjonen av Z-Gly-Pro-pNA ble variert fra 100-600 μ M. Selv om substratet Z-Gly-Pro-pNA var effektivt i å
 15 detektere enzymaktivitet, utelukket dets uløselighet ved høyere konsentrasjoner kinetiske målinger under substratmettede forhold. I motsetning hadde Succinyl-Ala-Pro-pNA fordelen av høy vannløselighet ved alle pH-verdier testet, og var derfor et foretrukket substrat for kinetikkstudier. Hydrolyse av Suc-Ala-Pro-pNA by FM, SC og MX PEP ble monitorert i en reaksjonsblanding (300 μ l) inneholdende 30 μ l av 10X PBS buffer, en sluttkonsentrasjon på 0,01-0,02 μ M enzym, og Suc-Ala-Pro-pNA (5 mM
 20 stokkløsning) ved sluttkonsentrasjoner varierende mellom 100 μ M til 4 mM. Frigjøringen av p-nitroanilidet ble spektrofotometrisk detektert ved en bølgelengde på 410 nm. Den initiale hastigheten av reaksjonen ble bestemt ved økningen i absorbans ved 410 nm, som ble benyttet for å kalkulere K_m og K_{cat} i henhold til Michaelis-Menten-forholdet. For måling av innflytelsen av pH på enzymaktiviteten, ble en serie av pH
 25 bufferløsninger preparert ved å benytte sitronsyre og dinatriumfosfat for pH-verdier fra 3,0 til 6,0, og natriumfosfater for pH-verdier 7,0 til 8,0. Reaksjonsblandinger (300 μ l) besto av 30 μ l av 10X pH buffer, sluttkonsentrasjon av 0,01 μ M enzym, og Suc-Ala-Pro-pNA til sluttkonsentrasjoner mellom 100 μ M til 4 mM.

30 *pH Stabilitet.* Stabiliteten til å beholde enzymaktivitet etter eksponering for sure omgivelser ble bestemt. Saltsyreløsninger (10 μ l) ved pH-verdier varierende fra 1,5 til 4,0 ble blandet med 1 μ l av enzym i 10-20 min. De sure blandinger ble så nøytralisert

med 40 μ l av 10X PBS løsning, 60 μ l av 5 mM substrat til et sluttvolum på 300 μ l. Den gjenvunne enzymaktiviteten ble målt spektrofotometrisk og sammenlignet med ikke-syrebehandlede kontroller under identiske forhold.

5 *Gastrisk og pankreatisk proteasestabilitet.* I en 96-brønners U-bunnplate ble det plassert 5 μ l av 2x reaksjonbuffer (40 mM Na₂HPO₄, pH = 6,5 for pankreatiske enzymer eller 20 mM HCl for pepsin), og 1 μ l av det degraderende enzymet (enten 1 mg/ml pepsin eller en cocktail av 1 mg/ml trypsin, 1 mg/ml chymotrypsin, 0,2 mg/ml elastase og 0,2 mg/ml karboksypeptidasae A) etterfulgt ved 4 μ l av PEP (5-10 U/ml) ble
 10 tilsatt. Platen ble inkubert ved 37°C i ulike tider (for eksempel 0, 5, 10, 20 og 30 min), med 190 μ l av PEP substratløsning (2 μ l Z-Gly-Pro-p-nitroanilid (16,8 mg/ml i dioksan) 14 μ l dioksan, 24 μ l vann, 150 μ l 10 mM PBS buffer, pH = 7,5) tilsatt til hver brønn. Absorpsjon ble målt ved 410 nm i 1 til 2 min hver 10 s for å teste gjenværende aktivitet. Hver buffer inneholdt også 5 mg/ml gluten. Ubehandlet gluten ble benyttet for pepsin,
 15 mens gluten tidligere proteolysert med pepsin (0,01 M HCl, pH = 2,0, 1:50 v/v, 2 t, 37°C) ble benyttet for all andre enzymer. Brønner inneholdende syre (pH = 2,0) ble nøytralisert ved tilsetning av 10 μ l 0,1 M NaOH før tilsetning av PEP-substratet. Enzymaktiviteter er uttrykt som en prosentandel av den maksimale aktiviteten, vanligvis observert ved nulltidspunktet.

20

Substratspesifisitet. I tillegg til referansesubstratenen ovenfor, ble enzymspesifisitet også evaluert ved å benytte to immunogene peptider derivert fra sekvensen av γ -gliadin proteiner i gluten. Begge peptider ble syntetisert ved å benytte fast-fase peptidsyntese. Peptidet (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP inneholder den immunodominante γ II-
 25 epitopen, og er resistent for proteolyse ved pepsin eller ethvert pankreatisk enzym. PEP-spesifisitet mot dette substratet ble bestemt i en konkurrerende test hvor 100 μ M (SEQ ID NO:12) PQPQLPYPQPQLP og 100 μ M Suc-Ala-Pro-pNA ble blandet og reagert med 0,02 μ M PEP ved 25°C. Den initielle hastigheten av Suc-Ala-Pro-pNA kløyving ble målt spektrofotometrisk, mens den initielle hastigheten av (SEQ ID NO:13)
 30 PQPQLPYPQPQLP hydrolyse ble bestemt via HPLC. Den tilsynelatende spesifisiteten, kcat/KM, for hydrolysen av (SEQ ID NO:14) PQPQLPYPQPQLP kunne bli bestemt basert på den kjente kcat/KM av enzymet for Suc-Ala-Pro-pNA og de observerte

For å undersøke kjedelengdespesifisiteten av individuelle PEPer, utførte vi konkurrerende reaksjoner inneholdende både gluten-deriverte peptider, utsatte reaksjonsblandingen for RP-HPLC, og monitorerte forsvinningen av hvert substrat som en funksjon av tid. Topparealene av 33-meren (32,5 min) og (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP (27,5 min) ble integrert.

In Vivo endopeptidaseaktivitet. En voksen (hunn eller hann) rotte ble anestetisert og opprettholdt ved 36-37°C under hele den kirurgiske prosedyren. Det peritoneale hulrommet ble åpnet, og et lite innsnitt ble gjort ved starten og slutten av et 15-20 cm jejunumsegment. Polyetylenkatetere ble satt inn og sikret i de to endene. Innløpskateteret ble forbundet via en pumpe-styrt sprøyte fylt med en løsning. Jejunumsegmentet ble perfusert initilt med PBS buffer for å fjerne alle restdebrier ved en strømningshastighet på 0,4 ml/min. Rensede peptidløsninger (peptidkonsentrasjon varierende fra 25-100 µM) ble så perfusert ved 0,4 ml/min gjennom jejunumsegmentet med en 10-40 min oppholdstid. I tilfellet av en ko-perfusjon er innløpskateteret forbundet med to samtidige sprøyter, en med en peptidløsning og den andre med prolyl-endopeptidaseløsningen (konsentrasjon varierende fra 50-500 µU/µl). Væske fra utløpskateteret ble samlet i små sentrifugerør i tørris for påfølgende analyse. De samlede fordøyelsesproduktene ble analysert ved HPLC på en C18 kolonne.

Resultater

PEP proteinekspresjon. FM og SC PEPer har sine egne signalsekvenser, og ble derfor uttrykt som utskilte, løselige enzymer i det periplasmiske rommet av *E. coli*. En enkel lysisprosedyre ved frysetørking førte til gjenvinning av periplasmisk protein uten signifikant kontaminering ved cytoplasmiske proteiner. I motsetning mangler MX PEP en naturlig signalsekvens, og ble derfor uttrykt som et cytoplasmisk protein. PEP ble renset fra hvert lysate ved Ni-NTA affinitetsrensing, etterfulgt ved et andre kromatografisk trinn. Utbyttene av aktive FM, SC og MX PEPer var henholdsvis 1 mg/l, 60 mg/l og 30 mg/l. Renhetn av de ulike PEPer ble bestemt ved SDS-PAGE til å være >90%.

Kinetisk analyse med referansesubstrater. Aktiviteten av hver PEP ble initielt evaluert ved å benytte det standard kromogene substratet succinyl-Ala-Pro-pNA. Frigjøring av p-nitroanilinet ble detektert ved 410 nm, og kinetiske data ble tilpasset Michaelis-Menten-forholdet. Succinyl-Ala-Pro-pNA ble valgt som et referansesubstrat i stedet for det alminnelig benyttede Z-Gly-Pro-pNA på grunn av den lave løseligheten av det sistnevnte substratet, som krever anvendelse av ko-løsningsmidler. De kalkulerte k_{cat} og K_M verdiene av FM, MX og SC PEP for succinyl-Ala-Pro-pNA er plassert i tabell (tabell 1). Mens disse enzymene alle viser sammenlignbart nivå av aktivitet til den av en serinprotease, har MX PEP høyere spesifisitet enn FM PEP, imens SC PEP har et mellomliggende nivå av spesifisitet (tabell 2). Den høyere spesifisiteten av MX kan hovedsakelig tilskrives dens høyere affinitet for substratet, som gjenspeiles i K_M .

Tabell 1. Kinetiske parametere for Succinyl-Ala-Pro-p-nitroanilidhydrolyse ved FM PEP, MX PEP og SC PEP.

15

	K_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	K_{cat}/K_M (mM^{-1}/s^{-1})
FM PEP	33	0,91	37
MX PEP	51	0,35	146
SC PEP	144	2,1	67

Tabell 2. Spesifisitet av FM PEP, MX PEP og SC PEP for det immunogen gliadinpeptidet (SEQ ID NO:4) PQPQLPYPQPQLP.

20

	K_{cat}/K_M (mM^{-1}/s^{-1})
FM PEP	178
MX PEP	548
SC PEP	492

Enzymaktivitet kontra pH. Den lumenale omgivelsen av tolvfingertarmen er omtrentlig ved pH 6. Derfor må en terapeutisk nyttig PEP beholde høy spesifikk aktivitet ved det pH. Stabil tilstand omsetningshastigheten, k_{cat} , for hver PEP ble titrert i ulike pH-forhold ved å benytte 100-4000 μ M succinyl-Ala-Pro-pNA, vist på fig. 1. Både FM PEP og MX PEP viste aktivt sete pKa omkring pH 6, som indikerer optimal aktivitet i pH 6-8 området. Den reduserte aktiviteten av begge enzymer ved pH 5 er konsistent med den

godt etablerte rollen av en histidinresidue som den generelle basen i den serinprotease katalytiske triaden, men alternativt kan det indikere en endring fra den aktive enzymkonformasjonen til en inaktiv tilstand. Slike konformasjonsmessige endringer har blitt implisert i den katalytiske cyklen av den strukturelt karakteriserte svinehjernen PEP.

- 5 Interessant viser SC PEP, som har den bredeste pH-profilen, en markert økning i maksimal hastighet under svakt basiske forhold.

PEP stabilitet. Selv om oralt administrerte terapeutiske proteiner kan bli formulert for å beskytte dem fra de sure og proteolytiske omgivelsene av magesekken, er trolig indre
 10 syrestabilitet av en PEP en ønskelig egenskap i dens anvendelse som et terapeutisk middel for cøliaki. Vi evaluerte derfor omfanget hvorved aktiviteten av hver PEP blir intakt etter 10 min av inkubasjon ved valgte pH-verdier mellom 1,6 og 3,9. Innenfor dette pH-området beholdt FM PEP 50-70% av sin opprinnelige aktivitet; MX PEP beholdt 70-90% aktivitet; og SC PEP beholdt 30-80% aktivitet. Selv om alle PEPer
 15 viser seg å være moderat syrestabile, er MX PEP mest allsidig. Siden terapeutisk virkeevne vil kreve en PEP å virke på gluten sammen med pankreatiske proteaser som er skilt ut i tolvfingertarmen, ble motstandsdyktigheten av FM PEP og MX PEP mot både gastriske og pankreatiske enzymer evaluert. For dette pre-inkuberte vi enzymene med fysiologiske mengder av enten pepsin (ved pH 2) eller en cocktail omfattende
 20 trypsin, chymotrypsin, elastase og karboksypeptidase A (ved pH 6,5). Som kan bli sett i fig. 2, var både FM og MX PEP sterkt mottagelig for pepsinkatalysert proteolyse, imens de viste seg å være betraktelig stabile for destruksjon i nærværet av fysiologiske mengder av pankreatiske enzymer.

25 *Kinetisk analyse ved å benytte PQPQLPYPQPQLP som et substrat.* Det immunogene peptidet PQPQLPYPQPQLP er en tilbakevendende sekvens i γ -gliadins, og er resistent for proteolyse ved gastriske og pankreatiske proteaser. Det er også sterkt resistent for fordøyning ved intestinale børstesømpeptidaser, med bare dipeptidylkarboksypeptidase I (DCP1) i stand til å virke på det. Behandling av dette peptidet med PEP resulter i
 30 kløyving av indre prolinresiduer, som videre genererer nye gjenkjennings seter for børstesøm aminopeptidaser. (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP representerer derfor et godt testsubstrat for å teste PEP spesifisitet.

k_{cat}/K_M verdier for hver PEP ble bestemt i en testblanding inneholdende (SEQ ID NO:11) PQQQLPYPQQQLP så vel som Suc-Ala-Pro-pNA som et konkurrerende substrat. Hastighetene av forsvinning av begge substrater ble bestemt ved uavhengige
 5 deteksjonsmetode. Den initielle hastigheten av forsvinning av (SEQ ID NO:11) PQQQLPYPQQQLP ble målt ved HPLC, mens hastigheten av forbruk av Suc-Ala-Pro-pNA ble målt spektrofotometrisk. Både FM og MX PEP hadde en 5 ganger høyere spesifisitet for glutenpeptidet sammenlignet med det kromogene substratet, imens SC PEP viste en 7 ganger økning i spesifisitet for glutenpeptidet (tabell 2). Denne økningen
 10 i spesifisitet antyder at lenger peptider kan tilveiebringe ytterligere ankere ved det katalytiske setet, en hypotese som er konsistent med observasjonen at Ala-Pro-pNA (som mangler en N-terminal succinylgruppe eller en karboksybenzylgruppe) ikke reagerte med noen av PEPene.

15 For å analysere regiospesifisiteten av hydrolyse av (SEQ ID NO:11) PQQQLPYPQQQLP ved individuelle PEPer, ble prøver korresponderende til tidlige tidspunkter videre analysert ved LC/MS/MS. Resultatene, vist i fig. 3A-3D, viste at hver PEP har unike subsetpreferanser. Mens det foretrukne setet av kløyving ved FM PEP var ved (SEQ ID NO:11) PQQQLPPYP|QQQLP posisjonen, kløyvet MX PEP
 20 fortrinnsvis det samme peptidet ved (SEQ ID NO:11) PQQQLP|YPQQQLP posisjonen. SC hadde sammenlignbar preferanse for begge setene av kløyving. Alle enzymer kløyvet fortrinnsvis peptidet ved en prolin lokalisert nær midten av sekvensen, som belyser deres funksjonelle forskjell fra prolyl-spesifikke eksopeptidaser slik som DPP IV.

25

Kjedelengdetoleranse og selektivitet. Det har blitt antydnet at prolylendopeptidaser fra serinproteasefamilien er begrenset med hensyn på kjedelengder av potensielle substrater. For å teste denne hypotesen i sammenhengen av de tre bakterielle PEPene studert her, sammenlignet vi deress hydrolytiske aktiviteter mot en fysiologisk relevant 33-mer
 30 peptidsekvens fra hvetegliadin, LQLQFPQPQLPYPQQQLPYPQQQLP YPQQQPF (fig. 4A). FM PEP (0,1 μ M) var i stand til å hydrolysere 10 μ M av 33-meren på omkring 2-3 minutter, imens SC PEP krevde > 1 time for å nå et sammenlignbart

sluttpunkt. Basert på initielle hastigheter, ble FM PEP estimert til å virke 5 ganger raskere på 33-meren enn MX PEP, og >20 ganger raskere enn SC PEP. SC PEP viser seg derfor å ha en kraftig kjedelengderestriksjon for lange peptidsubstrater.

- 5 Intermediatene og produktene fra hydrolyse av 33-meren ved FM og MX PEP ble analysert ved LC/MS/MS (fig. 4B-C). Flere momenter er bemerkelsesverdige. Først, til og med ved relativt tidlige tidspunkter, var fordøyelsesproduktene av MX PEP hovedsakelig små fragmenter, mens FM PEP fordøying ga en signifikant samling av lange intermedialer slik som LQLQPFQPQLPYPQPQLP, LQLQPFQPQLPYP og
- 10 LQLQPFQPQLP. Selv om begge PEP er i stand til å effektivt proteolysere 33-meren, har de distinkte hydrolytiske mønstre på dette komplekse substratet. Enten viser MX PEP seg å være fremadskridende (dvs. for hvert 33-mer substratmolekyl, kløyver den sekvensielt alle de foretrukne setene i kjeden før frigjøring), eller alternativt har enzymet en sterk bias mot kortere kjedesubstrater. Det kan også bli bemerket at de C-
- 15 terminale fragmentene generert ved de to enzymene er forskjellige (QPQPF for FM PEP og YPQPQPF for MX PEP). Disse funnene er konsistente med observert sub-sete preferanse i tilfellet av (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP fordøyelse.

- For å direkte undersøke kjedelengdeselektivitet av de tre enzymene, ko-inkuberte vi
- 20 (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP og LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF med hver PEP (fig. 6A-C). Både SC PEP og MX PEP viste en klar preferanse for 13-merpeptidet, mens FM PEP viste sammenlignbar selektivitet for begge peptider.

- 25 For ytterligere å evaluere substratpreferansene, ble (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP og 33-meren blandet med pepsinbehandlet gluten og tillatt å reagere med pankreatiske enzymer i nærværet av BBM og enten FM PEP eller MX PEP. Som sett i HPLC skissen (fig. 6A-B), hadde 33-meren den lengste retensjonstiden, mens (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP og andre middels-lengde glutenpeptider ble
- 30 eluert tidligere. Her proteolyserte også FM PEP (SEQ ID NO:11) PQPQLPYPQPQLP, 33-meren og andre glutenpeptider ved sammenlignbare hastigheter (fig. 6A). I MX PEP

fordøyelsen var PQPQLPYPQPQLP og andre mindre peptider raskt brutt ned (på 10 minutter), mens hydrolyse av 33-meren foregikk ved en saktere hastighet (fig. 6B).

In Vivo hydrolyse. For å validere innblandingene av de ovenfor biokjemiske

5 observasjonene for peptidfordøying i den intakte tynntarmen, ble hver PEP ko-perfusert i rottejunum med 33-mer peptidsubstratet, og utløpsvæsken samlet ved en distanse på 15-20 cm fra punktet av perfusjon ble analysert. I denne levende dyremodellen er innvirkningen av samtidig virkning av perfusert (luminal) PEP og børstesøm (overflate) peptidasene bestemt. Som vist ved in vitro resultatene ovenfor, mens BBM enzymene
10 var utilstrekkelige til å prosessere 33-meren, fremmet FM PEP mer fullstendig nedbrytning av 33-meren enn både MX og SC PEP (fig. 7). Innenfor et PEP doseområde på 50-500 $\mu\text{U}/\mu\text{l}$ økte omfanget av 33-mer hydrolyse med økende PEP dose, som demonstrerer at høyere doser av PEP kan akselerere glutennedbryting i den mammalske tarmen.

15

I lys av nylige funn som relaterer den sterke antigenisiteten av gliadinpeptider til deres eksepsjonelle motstandsdyktighet for fordøying, ble prolylendopeptidaser identifisert som en potensiell interessant familie av enzymer for oral cøliakiterapi. Å forstå de enzymologiske egenskapene av disse enzymene er et essensielt krav for slik anvendelse.
20 I studien ovenfor ble prolylendopeptidaser fra tre bakterielle kilder valgt og uttrykt i *E. coli* som rekombinante proteiner, og ble deretter renset og karakterisert. To av disse enzymer (fra *F. meningosepticum* og *S. capsulata*) har blitt rapportert tidligere, mens det tredje enzymet (fr *M. xanthus*) representerer et nytt medlem av prolylendopeptidasefamilien.

25

For å undersøke de endoproteolytiske egenskapene av disse enzymene, er det viktig å benytte peptidsubstrater med innvendige kløyvings seter. Selv om modellsubstrater slik som Z-Gly-Pro-pNA eller Suc-Ala-Pro-pNA hyppig har blitt benyttet for å identifisere og karakterisere polylendopeptidaser, tilveiebringer disse substratene alene ingen
30 fullgod innsikt til å differensiere endopeptidaser fra hverandre eller fra proline-spesifikke aminopeptidaser (slik som dipeptidylpeptidase IV (DPP IV)). I sammenhengen av cøliaki, har to peptider (PQPQLPYPQPQLP og

LQLQPFQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF) blitt gjenkjent som nyttige prober for å studere de fundamentale egenskapene av prolylendopeptidaser, så vel som for deres potentiale for å detoksifisere gluten. Peptidet PQQQLPYQPQLP inneholder en epitop funnet i γ -gliadiner som har blitt vist til å spille en immundominant rolle i T-celle
 5 mediert respons til gluten i tarm med cøliaki. Det kan bli ikke bli kløvet ved noen gastriske eller pankreatiske proteaser og er også sterkt resistent for fordøyning ved intestinale børstesømmembran (BBM) peptidaser, med bare dipeptidylkarboksy-peptidase I i stand til å virke på det ved en veldig begrenset hastighet. Effektiviteten av intestinal metabolisme av dette peptidet kan derfor bli forventet til å forbedres i
 10 nærværet av en eksogen prolylendopeptidase, som har blitt verifisert i denne studien. Behandling av dette peptidet med PEP resulterer i kløyving av en indre prolinresidue, som videre genererer et nytt gjenkjenningssete for børstesøm aminopeptidaser. PQQQLPYQPQLP representerer derfor en a god probe for PEP spesifisitet.

15 33-mergliadinpeptidet LQLQPFQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF ble valgt som en komplementær probe for disse studiene, fordi det er et stabilt, fysiologisk derivert produkt av gastrisk og pankreatisk fordøyning av γ -gliadin, og stimulerer sterkt proliferasjon av gluten-reaktive T-celler fra praktisk talt alle cøliakipasienter testet så langt. Endoproteolytisk nedbryting av dette 33-merpeptidet representer derfor et spesielt
 20 utfordrende mål for en eksogen PEP. Lignende de fleste andre antigene glutenpeptider, inneholder 33-meren multiple prolinresiduer, og kan bli forventet til å presentere mer enn et kløyvingssete for en PEP. Samtidig antyder dets multivalente karakter at PEP virkning alene lite trolig eliminerer all gjenværende antigenisitet av dette peptidet. Kombinert virkning av en PEP og de endogene peptidasene av den intestinale børste-
 25 sømmembranen er følgelig nødvendig for immunologisk nøytralisering og dietttilpasning av dette lange prolinrike peptidet.

Våre undersøkelser av de molekylære gjengjenningssegenskapene av tre bakterielle PEPer for to gliadinpeptider har vist minst to interessante og potensielt viktige egen-
 30 skaper av disse enzymene. Først, selv om alle tre PEPer testet her viste høy spesifikk aktivitet mot referansekromogene substrater (tabell 1), viste de bemerkelsesverdige forskjeller i kjedelengdespesifisitet (fig. 3A-C). Mens SC PEP og MX PEP hadde

høyere spesifisitet for PQQQLPYPQQQLP enn FM PEP (tabell 2), var det motsatte tilfellet for det lenger 33-mer gliadinpeptidet (fig. 4A), spesielt i tilfellet av SC PEP, som hadde ekstremt dårlig aktivitet mot 33-meren.

5 Strukturell og biokjemisk analyse første til forslaget om at aktiviteten av PEPer er begrenset til substrater som inneholder mindre enn 30 aminosyreresiduer. I denne sammenhengen er den gode aktiviteten av MX PEP og særlig FM PEP mot 33-mer peptidet overraskende. Den kjedelengdetoleransen av FM PEP er virkelig demonstrert I konkurrerende *in vitro* og *in vivo* tester, hvor FM PEP var i stand til å prosessere lenger I
10 og kortere substrater ved sammenlignbare hastigheter. For det andre demonstrerte sekvensanalyse av de viktigste proteolytiske produktene derivert fra begge gliadinsubstrater at PEPer hadde distinkt sub-setespesifisitet så vel som regiospesifisitet i sammenhengen av den lenger repetitive sekvensen. For eksempel kløyet FM PEP fortrinnsvis ved PQQQLPYP|QQQLP, mens MX PEP foretrakk PQQQLP|YPQQQLP
15 sete, og SC PEP hadde sammenlignbar aktivitet mot begge seter.

På lignende måte understreket sekvensanalyse av initielle hydrolytiske produkter av 33-merpeptidet regiokjemiske forskjeller mellom FM PEP og MX PEP. Mens MX PEP behandling genererte fragmenter for det meste av 4-5 residuer (antagelig prosessert
20 sekvensielt fra begge ender), ga FM PEP lenger intermediater (antagelig som et resultat av en preferanse for kløyving nær senteret av peptidet). De aktive setene av disse enzymene er på denne måten klart forskjellige, som videre har potensielle innvirkninger for anvendelsen av disse enzymene for å detoksifisere gluten i dietten til en cøliaki-pasient.

25

I tillegg til å analysere substratspesifisitet, har vi også undersøkt andre terapeutisk relevante egenskaper av vårt sett av tre PEPer. De inkluderer pH-avhengighet av enzymaktivitet, syretoleranse av proteinet og motstandsdyktighet mot inaktivering ved gastriske, pankreatiske og intestinale proteaser/peptidaser. Alle enzymer har en pH-
30 aktivitetsprofil som er godt tilpasset de mildt sure omgivelsene av den øvre tynntarmen (pH 6-6,5). De viser seg også å være moderat stabile mot syreeksposering så vel som pankreatisk protease (men ikke pepsin) virkning, hvor MX PEP er den mest stabile.

Enzymene beholder også aktivitet i den intakte lumen av tynntarmen av en rotte, indikativ for deres stabilitet mot både intestinale sekresjoner så vel som børstesøm membranpeptidaser. Til slutt varierer ekspresjonsnivåene av disse enzymene signifikant i rekombinant *E. coli*. Spesifikt, i sammenligning med FM PEP, var ekspresjonsnivåene av SC og MX PEPer hovedsakelig overlegne.

Svinehjerne PEP har en didomaine arkitektur, som inkluderer et uvanlig β -propell domaine som viser seg å regulere proteolys. Parvise sekvensoppstillinger mellom denne strukurelt karakteriserte PEP og FM, MX og SC PEP viser henholdsvis 39% (49%), 36% (45%) og 40% (48%) identitet (likhet). Disse oppstillingene antyder også at de bakterielle PEPene er omfattet av et katalytisk og et β -propelldomaine. Siden deres aktive seter er antatt å ligge nær grenseflaten mellom de to domainene, kan mutagenese av inter-domainegrenseflaten endre proteindynamikk og videre påvirke substrattoleranse og spesifisitet.

Resultatene ovenfor tilveiebringer en basis for forsøk av proteinmanipulasjon av PEP enzymer. Denne familien av serinproteaser inkluderer tallrike andre antatte homologer hvis cDNAer har blitt sekvensert, men hvis genprodukter fortsatt ikke er karakterisert. I lys av de gunstige egenskapene av MX PEP, som var uttrykt og karakterisert for første gang som del av denne studien, vil det være nyttig å screene ytterligere vill-type enzymer.

EKSEMPEL 2

Heterolog ekspresjon av PEP i *Lactobacilli*

I en utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er en cøliakipasient tilveiebrakt med en rekombinant organisme modifisert til å uttrykke en PEP av oppfinnelsen. Den rekombinante organismen er valgt fra de organismene som kan kolonisere i intestinal mucosa uten skade for pasienten, som derved tilveiebringer en endogen kilde av PEP for pasienten. Som et eksempel, kan *Lactobacilli* slik som *L. casei* og *L. plantarium* kolonisere intestinal mucosa og skille ut PEP enzymer lokalt. Gitt deres utstrakte anvendelse i matprosessering, kan de også bli benyttet som en effektiv kilde av PEP for industriell (for å behandle matvarer) og medisinsk (for å fremstille PEP for farmasøytisk

formulering) anvendelse. PEPer er uttrykt i slike *Lactobacilli* ved å benytte standard rekombinante DNA teknologier. For eksempel har Shaw *et al.* (Shaw, DM, Gaerthe, B; Leer, RJ, Van der Stap, JGMM, Smittenaar, C.; Den Bak-Glashouwer, Heijne, MJ, Thole, JER, Tielen FJ, Pouwels, PH, Havenith, CEG (2000) *Immunology* 100, 510-518) konstruert *Lactobacilli* arter for å uttrykke intracellulært og overflatebundet tetanus toksin. De intakte PEP genene (som inkluderer ledersekvenser for effektiv bakteriell sekresjon) er klonet inn i shuttle ekspresjonsvektorer slik som pLP401 eller pLP503 under kontroll av henholdsvis (regulerbare) amylasepromoterer eller (konstitutive) laktatdehydrogenasepromoterer. Alternativt er rekombinant matvaregrad *Lactobacilli* stammer generert ved setespesifikk rekombinasjonsteknologi (for eksempel se. Martin MC, Alonso, JC, Suarez JE, og Alvarez MA *Appl. Env. Microbiol.* 66, 2599-2604, 2000). Standard dyrkingsforhold er benyttet for *Lactobacilli* fermentering, slik som den beskrevet ved Martin *et al.*

15 EKSEMPEL 3

Heterolog ekspresjon av PEP i gjær

Både naturlig forekommende og rekombinante celler og organismer er benyttet for å produsere glutenasene nyttige i å praktisere den foreliggende oppfinnelsen. Foretrukne glutenaser og produserende celler inkluderer dem fra organismer kjent til å være generelt ansett som trygge, slik som *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Sphingomonas*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, *Xanthomonas*, *Pyrococcus*, *Bacillus* og *Streptomyces*. Ekstracellulære glutenaseenzymer kan bli oppnådd fra mikroorganismer slik som *Aspergillus oryzae* og *Lactobacillus casei*. Foretrukne celler inkluderer dem som allerede er benyttet i fremstillingen av matvarer, men som har blitt modifisert til å uttrykke en glutenase nyttig i praktiseringen av den foreliggende oppfinnelsen. Som et eksempel, er gjærstammer slik som *Saccharomyces cerevisiae* nyttig for ekspresjon i høyt nivå av utskilte heterologe proteiner. Gener som koder for enhver av PEPene beskrevet ovenfor (bare modent protein) er klonet inn i ekspresjonsplasmider designed for optimal produksjon av utskilte proteiner. Et eksempel på en slik heterolog ekspresjonsstrategi er beskrevet i Parekh, R.N. og Wittrup, K.D. (*Biotechnol. Prog.* 13, 117-122, 1997). Enten kan selv-replikserende (for eksempel 2 mikron) eller integrer-

ende (for eksempel pAUR101) vektorer bli benyttet. GAL1-10 promoteren er et eksempel på en induserbar promoter, imens ADH2 promoteren er et eksempel på en konstitutiv promoter. cDNA som koder for den modne PEP er fusjonert nedstrøms for en ledersekvens inneholdende en syntetisk pre-proregion som inkluderer et signal-
 5 kløyvingssete og et Kex2p kløyvingssete. *S. cerevisiae* BJ5464 kan bli benyttet som en vert for produksjon av peptidasen. Rysteflaskefermenteringsforhold er beskrevet ved Parekh og Wittrup i den ovenfor siterte referansen. Alternativt kan fed-batch kulturer av høy celletetthet bli benyttet for produksjon i stor skala av peptidasene; en representative prosedyre for dette formålet er beskrevet i Calado, C.R.C, Manesse, M., Egmond, M.,
 10 Cabral, J.M.S. og Fonseca, L.P. (Biotechnol. Bioeng. 78, 692-698, 2002).

EKSEMPEL 4

Enterisk kapselformulering av prolylendopeptidase

15 Gelatinkapsler er fylt med 100 mg *Myxococcus xanthus* prolylendopeptidase og 10 mg av silikondioksid. Kapslene er enterisk belagt med Eudragit polymer og puttet i et vakuumkammer i 72 timer. Kapslene er så holdt ved et område av temperatur på 10°C til 37°C og et kontrollert fuktighetsnivå på 35-40%.

EKSEMPEL 5

Studier av enterisk kapselformulering av prolylendopeptidase

En studie er utført hvor pasienter med cøliaki er innrullet i en to uker lang studie. Gelatinkapsler inneholdende 90% *Myxococcus xanthus* prolylendopeptidase blandet
 25 med 10% silikondioksid er benyttet. Kapslene er håndfylt med blandingen, forenet og belagt med et 10% Sureteric enterisk belegg (en polymer av polyvinylacetatftalat utviklet ved det kanadiske datterselskapet av Merck & Company). Prøver er syretestet ved å eksponere belegget for 1N HCL en time for å simulere de sure omgivelsene av magesekken. Kapslene er så puttet i et vakuumkammer i 72 timer.

To 100 mg kapsler er administrert til hver pasient før hvert måltid. Pasientene er instruert til å spise alle typer av mat uten å holde seg unna dem som var kjent til å forårsake lidelse, for eksempel oppblåsthet, diarré og kramper.

5

EKSEMPEL 6

Enterisk pilleformulering av prolylendopeptidase

400 mg av L-vinsyre og 40 mg av polyetylen glykol-hydrogenert lakserolje (HCO-60) er oppløst i 5 ml av metanol. Denne løsningen er plassert i en morter tidligere oppvarmet til 30°C. Til denne løsningen er det tilsatt 100 mg av *Myxococcus xanthus* prolylendopeptidase. Øyeblikkelig etter tilsetningen av PEP, er blandingen omrørt med en støter under en varm luftstrøm (40°C) og så plassert i en desikkator under vakuum over natt for å fjerne løsningsmidlet. Den resulterende halvfasten er pulverisert med en støter og knadd med 30 mg av natriumbikonat og en liten mengde av 70% etanol. Blandingene er så delt inn og formet til piller av omkring 2 mm størrelse og grundid tørket. De tørkede pillene er gitt et belegg av hydroksypropylmetylcellulose ftalat (HP-55) for å oppnå en enterisk formulering.

EKSEMPEL 7

Endoproteaseaktivitet

Genet for en endoprotease (EPB2; PubMed adgangsnummer U19384, nt 94-1963) fra bygg (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*) ble subklonet inn i en pET28b (Invitrogen) vektor ved å benytte BamH1 og EcoR1 insettingseter; det resulterende plasmidet ble betegnet pMTB1. En inaktiv 43 kDa proproteinform av EPB2 ble uttrykt fra pMTB1 i cytoplasmaet av BL21 *E. coli* celler. Proproteinet ble oppløst fra inklusjonslegemene ved å benytte 7 M urea. Det oppløste proteinet ble rensset på en Ni-NTA kolonne. Auto-aktivering av proEPB2 til dets modne, aktive form ble oppnådd ved tilsetning av citrat-fosfatbuffer, pH 3 (preparert ved å blande 0,1 M natriumcitrat og 0,2 M natrium fosfat). Under slike sure forhold omdannes proEPB2 raskt til en moden form med en molekylær vekt på 30 kDa (fig. 2). Ved 72 timer gjennomgår modent EPB2 autolyse. N-terminal sekvensering gir en N-terminal sekvens som begynner med VSDLP.

30

Under sure forhold fordøyer den modne formen av EPB2 effektivt rensed α 2-gliadin, en kilde av peptider som er immunogene for mennesker som lider av cøliaki. Cystein-proteinaseinhibitoren, leupeptin, inhiberer denne aktiviteten, som bekrefter dens mekanisme som en cysteinprotease. pH optimumet av proEPB2 aktivering og α 2-gliadinfordøying er 2,4-3,5, som derfor kan tilveiebringer en behandling for cøliaki bestående av oral administrasjon av proEPB2.

EKSEMPEL 8

10 Formulering og analyse av virkeevne av *M. xanthus* PEP

Lyofilisering av *M. xanthus* PEP ble utført som følger. PEPen ble rensed som beskrevet i eksempel 1, og konsentrert til en initiell konsentrasjon på 7,7 mg/ml ved Tangential-Flow Filtration (TFF) ved å benytte en 10K MWCO Pellicon difiltreringsmembran (Millipore, PLCGC10, 50 cm, kat. nr. PXC010C50). TFF (ved å benytte en LabScale TFF fra Millipore, kat. nr. 29751) ble utført i omtrentlig 12 timer (trykk på 50 psi (retentat)/30 psi (permeant)), med periodisk tilsetning til reservoaret av 50 mM natrium fosfat, 3% sukrose pH 7,5. Deretter ble PEG-4000 tilsatt med en målkonsentrasjon på 1%. Den endelige proteinkonsentrasjonen var 70-100 mg/ml. Dette materialet ble sentrifugert, så lyofilisert. Lyofiliseringen ble utført i en firkantet petriskål (Falcon kat. nr. 35-1112) i en DuraStop frysetørker ved å benytte parametre beskrevet i tabellen nedenfor. Vanligvis ble 0,7-0,85 mg PEP presentert pr. mg av lyofilisert materiale. Ingen tap av spesifikk aktivitet av PEP ble observert ved lyofilisering.

Trinn	Temperatur	Trykk	Varighet	Rampehastighet
Frysing 1	-50°C	Atmofærisk	2 timer	0,3°C/minutt
Sammensmelting	-35°C	Atmosfærisk	3 timer	0,3°C/minutt
Frysing 2	-50°C	Atmosfærisk	2 timer	0,3°C/minutt
1° Tørking	-20°C	100 mTorr	16,9 timer	0,5°C/minutt
2° Tørking	+25°C	100 mTorr	8,0 timer	0,2°C/minutt

25 *P. Temp. = Gjennomsnittlig produkttemperatur ved slutt av trinn

**1° = Primær tørking

***2° = Sekundær tørking

Blanding for *M. xanthus* PEP ble utført som følger. Lyofiliserte kaker ble pulverisert til et lyst pulver. Alle prøver ble veid for gjenvinning og lagret i forseglede 50 ml koniske rør ved 4°C. En blanding ble preparert som vist nedenfor. Bindemidlene ble valgt for å tilveiebringe korrekte strømnings- og disintegrasjonsegenskaper for den forede blandingen.

Rekkefølge av tilsetning	Bindemiddel	Prosentandel
1	Lyofilisert enzymkake / pulver	63%
2	Kalsiumsilikat	2%
3	Talkum	5%
4	Krospovidon	5%
5	Avicel	25%

Det lyofiliserte enzymet og bindemidlene ble forenet i en V-blander i flere timer. Matrialet ble så benyttet for å lage enterisk-belagte kapsler eller tableter. 100-150 mg *M. xanthus* PEP kan bli lastet inn i en enkel hard gelatinkapsel, størrelse 00 (Capsugel). Alternativt kan Vcap vegetabiliske kapsler (størrelse 00, Capsugel) også bli benyttet uten innvirkning på enzymaktivitet.

15

For enterisk belegging av kapslene, ble en løsning av enterisk belegg preparert som vist nedenfor:

Rekkefølge av tilsetning	Bindemiddel	Mengde tilsatt
1	RODI vann	49,5 ml
2	Talkum	8,1 g
3	Eudragit L50 D-55	111,0 ml
4	Trietylcitrat	1,62 ml

20

Det enteriske belegget ble blandet kraftig i et beger på en røreplate. Løsningen ble så dekantert i en sprayflaske. Rottekapsler ble forsiktig spredd ut på papirhåndklær i grupper på 20 og løsningen av enterisk belegg sprayet på kapslene. Varm luft ble benyttet for å delvis tørke kapslene før de ble flyttet til et tørt papirhåndkle hvor de

lufttørket i 30 minutter før det neste belegget ble påført. Totalt 3 belegg ble påført for å dekke alle sidene av kapslene. Disse ble lufttørket flere timer før de ble overført til en lagringsbeholder. Selv om noen aktivitet av PEPen er tapt som et resultat av enterisk belegging, er en vesentlig fraksjon av aktiviteten beholdt, og er stabilt i minst 1 måned
5 ved 4°C lagring.

En alternativ fremgangsmåte for å formulere enzymet for intestinal levering er en enterisk belagt tablett. Tablettene har fordelen av mer rask oppløsning i de svakt sure omgivelsene av den øvre tynntarmen. En annen fordel av tablettformuleringen er at mer
10 enzym kan bli sammenpresset til et mindre volum enn for en kapsel. Deres primære problem er at proteiner hyppig denaturerer under høye trykk. I en fremgangsmåte av tablettfremstilling av *M. xanthus* PEP ble den samme lyofiliserte blandingen som ovenfor benyttet. Tabletter ble fremstilt ved en stansstyrke på 3000 psi holdt i 15 sekunder. Ingen aktivitet ble tapt i prosessen, som demonstrerer muligheten av
15 tablettformuleringer av dette enzymet.

For å teste virkeevnen av den enterisk belagte orale kapselformuleringen beskrevet ovenfor, ble to typer av tester utført. *In vitro* oppløsningstester ble utført på en Hanson SR8-Plus Dissolution Tester ved å benytte Simulated Gastric Fluid (SGF; 2 g/l NaCl,
20 pH 1,2, justert ved å benytte 6 N HCl) og Simulated Intestinal Fluid (SIF; 6 g/l monobasisk kaliumfosfat med eller uten 10 g/l pankreatin, pH 6,8, justert ved å benytte using 5 N NaOH). Enterisk belagte kapsler ble først testet for motstandsdyktighet for oppløsning i SGF i opp til 2 timer ved 37°C. Ingen proteinfrigjøring ble bemerket. Deretter ble kapslene utsatt for lignende oppløsningstester i SIF ved 37°C. En
25 vesentlig fraksjon av det innkapslede materialet ble frigjort på 15 min. Ved 30 min hadde materialet blitt fullstendig frigjort.

In vivo tester av kapslene ble utført i rotter ved å benytte mindre harde gelatinkapsler (størrelse 9 kapsler, Torpac). Omtrentlig 16 mg av den lyofiliserte
30 formuleringsblandingen ble innkapslet i hver enterisk belagte kapsel, som korresponderer til ~7 mg PEP. Rotter fastet over natt ble administrert oralt en PEP eller placebokapsel sammen med en målt mengde (300 mg gluten/kg kroppsvekt) av

glutensirup fremstilt som følger. 300 g kommersielt tilgjengelig hveteglutenmel (Bob's Red Mill, Milwaukie OR) ble tilsatt til 10 l av en 0,01 M HCl løsning for å oppnå en pH på 2,0. Pepsin (6,0 g, American Laboratories) ble tilsatt. Etter inkubering ved 37°C i 1 time ble pH justert til 2,0 ved tilsetning av 35 ml 1M HCl. Etter opprettholdelse i 5 ytterligere 2 timer ved 37°C ble løsningen nøytralisert ved tilsetning av 35 g av Na₂HPO₄, og pH ble justert til 7,9 med 10 M NaOH (32,5 ml).

Trypsin/Chymotrypsinpulver (3,75g) (Enzyme Development Corp; 1000 USP/mg i trypsin, 1000 USP/mg i chymotrypsin) ble så tilsatt, reaksjonen opprettholdt ved 37°C i 2 timer, pH 7,9 (pH re-justering til 7,9 etter 1 time, med 10 M NaOH) og oppvarmet ved 10 100°C i 15 minutter for å inaktivere enzymene. Den endelige glutenløsningen ble filtrert gjennom ostelerret for å fjerne gjenværende store partikler. Et PEP kapsel-føret dyr og et proforma kapsel-føret dyr ble avlivet etter 45 min og 90 min hver, og innholdene av tynntarmen ble analysert for gluteninnhold via C18 revers fase HPLC.

Kromatogrammer ble normalisert for totalt proteininnhold i hver prøve. Topp = 45 min, 15 Bunn = 90 min (grønn = placebo, blå = PEP kapsel).

Gluten-deriverte peptider eluerte i 20-30 min regionen. Ved 45 min så vel som 90 min, var det pepsin-trypsin-chymotrypsinbehandlede gluten minimalt metabolisert i de proforma førede dyrene, imens det viser seg å være grundig metabolisert. Sammen 20 indikerer disse resultatene at enterisk belagte PEP kapsler kan overleve de gastriske omgivelsene av magesekken, og katalysere proteolysis av kostpeptider i tynntarmen.

Den foreliggende oppfinnelsen har blitt beskrevet på vilkår av bestemte utførelsesformer funnet eller lagt frem ved oppfinneren til å omfatte foretrukne måter 25 for praktiseringen av oppfinnelsen. Det vil bli forstått ved dem av dyktighet i fagfeltet at, i lys av den foreliggende angivelsen, kan tallrike modifikasjoner og endringer bli gjort i de bestemte utførelsesformene, eksemplifisert uten å forlate den tiltenkte rekkevidden av oppfinnelsen. På grunn av biologiske funksjonelle ekvivalentbetraktninger, kan endringer bli gjort i fremgangsmåter, strukturer og 30 forbindelser uten å påvirke den biologiske virkningen i type eller mengde.

P a t e n t k r a v

1.

Formulering for anvendelse i behandling av cøliaki,

- 5 omfattende en prolylendopeptidase (PEP) og en glutaminendoprotease, sammen med et farmasøytisk akseptabelt bindemiddel.

2.

Formulering for anvendelse ifølge krav 1, hvori nevnte prolylendopeptidase er

- 10 *Flavobacterium meningosepticum* PEP, *Myxococcus xanthus* PEP, *Sphingomonas capsulata* PEP eller *Penicillium citrinum* PEP.

3.

Formulering for anvendelse ifølge krav 1, hvori nevnte prolylendopeptidase er

- 15 *Sphingomonas capsulata* PEP.

4.

Formulering for anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående krav 1 - 3, hvori nevnte glutaminendoprotease er cysteinprotease B fra *Hordeum vulgare*.

20

5.

Formulering for anvendelse ifølge krav 4, hvori nevnte cysteinprotease B er i en proenzymform som er aktivert under sure forhold.

25 6.

Formulering for anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående krav 1 - 5, hvori nevnte formulering er egnet for oral administrasjon.

7.

- 30 Formulering for anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående krav 1 - 6, hvori nevnte formulering omfatter et enterisk belegg.

8.

Formulering for anvendelse ifølge krav 1, hvori nevnte PEP er rensset ved affinitetskromatografi.

5

9.

Formulering for anvendelse ifølge krav 1, hvori nevnte PEP er lyofilisert.

10.

10 Formulering for anvendelse ifølge krav 1, hvori nevnte PEP er formulert i en farmakologisk enhetsdoseform.

11.

15 Formulering ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 7, 9 og 10 for anvendelse i en fremgangsmåte for å behandle glutenintoleranse hos en pasient.

12.

Formulering for anvendelse ifølge krav 11, hvori nevnte formulering er blandet med mat.

20

13.

Formulering for anvendelse ifølge krav 11 eller 12, hvori nevnte glutenintoleranse er assosiert med cøliaki.

25

14.

Formulering for anvendelse ifølge krav 1, hvori PEP og glutaminendoprotease er for administrering i form av to enzymdoser, der én dose inneholder PEP og den andre dosen inneholder glutaminendoprotease.

SEQUENCE LISTING

<110> SHAN, LU
 BETHUNE, MICHAEL
 KHOSLA, CHAITAN
 GASS, JONATHAN

<120> THERAPEUTIC ENZYME FORMULATIONS AND USES
 THEREOF

<130> STAN-361WO

<140> US2005/006129
 <141> 2005-02-23

<150> 10/969,314
 <151> 2004-10-19

<150> 60/565,668
 <151> 2004-04-26

<160> 45

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 1
 Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
 1 5 10

<210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic primer

<400> 2
 gataaaaacg gaaagcttgt aagggc

26

<210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 3
 Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic primer

<400> 4
 cccttaattt tcaaatttta gctcgagttt atgatttata 40

<210> 5
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic primer

<400> 5
 aggatatcca tatgaagaac cgcttgtgg 29

<210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic primer

<400> 6
 gacaacctcg aatccgctcgg cattg 25

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic primer

<400> 7
 caatgccgac ggattcgagg ttgtc 25

<210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic primer

<400> 8
 cgcggggacc tcgagtagaa actg 24

<210> 9
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic primer

<400> 9
 ctccccatat gtcctacccg gcgacc 26

<210> 10
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic primer

<400> 10

gtggcggcgc agggccgcaa gcttcccaag cg

32

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 11

Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro
1 5 10

<210> 12

<211> 33

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 12

Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
1 5 10 15
Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro
20 25 30
Phe

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 13

Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Gln Gln Gln
1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 14

Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr
1 5 10

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 15

Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr
1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 16

Gln Pro Gln Gln Ser Phe Pro Glu Gln Gln
1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 17

Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro
1 5 10

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 18

Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Leu Pro
1 5 10

<210> 19

<400> 19

000

<210> 20

<400> 20

000

<210> 21

<400> 21

000

<210> 22

<400> 22

000

<210> 23

<400> 23

000

<210> 24

<400> 24

000

<210> 25

<400> 25

000

<210> 26

<400> 26

000

<210> 27

<400> 27
000

<210> 28

<400> 28
000

<210> 29

<400> 29
000

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 30

Ile Gln Pro Gln Gln Pro Ala Gln Leu
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 31

Gln Gln Pro Gln Gln Pro Tyr Pro Gln
1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 32

Ser Gln Pro Gln Gln Gln Phe Pro Gln
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 33

Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 34

Pro Phe Ser Gln Gln Gln Gln Pro Val

1 5

<210> 35
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 35
 Phe Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Tyr
 1 5 10 15
 Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln
 20 25

<210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(1)
 <223> Glutamine with an O-AMINO-BENZOIC ACID moiety

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = Tyrosine with a NO2 attached

<400> 36
 Gln Pro Gln Gln Pro Xaa Asp
 1 5

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 37
 Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr
 1 5

<210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 38
 Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln
 1 5

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 39
 Pro Gln Gln Ser Phe Pro Gln Gln Gln
 1 5

<210> 40
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(1)
 <223> Glutamine with an O-AMINO-BENZOIC ACID moiety

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Tyrosine with a NO2 attached

<400> 40
 Gln Leu Pro Xaa Pro Gln
 1 5

<210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(1)
 <223> Proline with an O-AMINO-BENZOIC ACID moiety

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Tyrosine with a NO2 attached

<400> 41
 Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Xaa
 1 5

<210> 42
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)...(4)
 <223> Lysine with an O-AMINO-BENZOIC ACID moiety

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Tyrosine with an NO2 attached

<400> 42
 Pro Gln Pro Lys Leu Pro Xaa Pro Gln Pro Gln Leu Pro
 1 5 10

<210> 43
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Triticum aestivum

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Tyrosine with a NO2 attached

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)...(11)

<223> Lysine with an O-AMINO- BENZOIC ACID moiety

<400> 43

Pro Gln Pro Gln Leu Pro Xaa Pro Gln Pro Lys Leu Pro
 1 5 10

<210> 44

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic primer

<400> 44

aaccaatcat atgaagtaca acaaactttc tgtg

34

<210> 45

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic primer

<400> 45

gcccttataaa gctttccggt tttatc

26

1 / 11

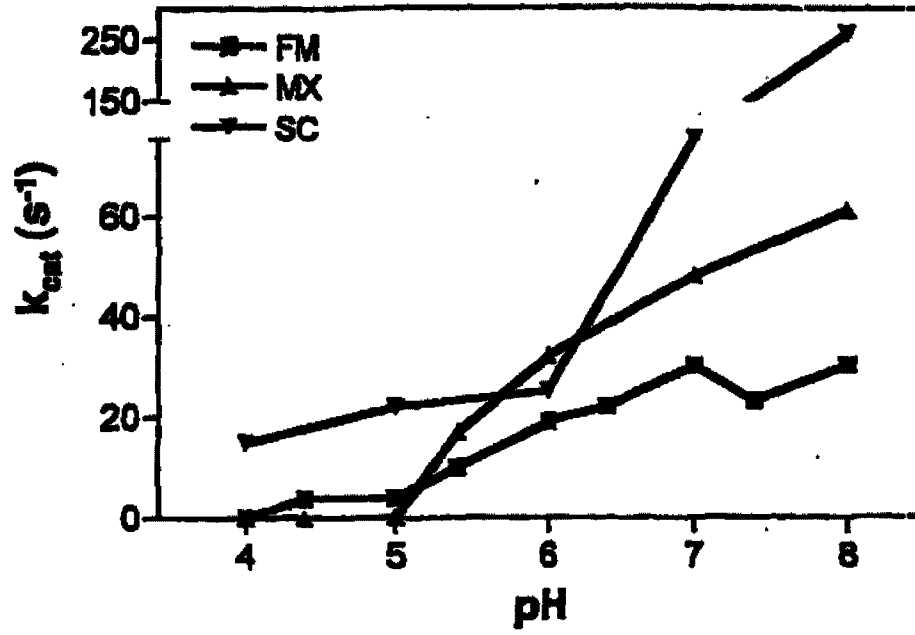


FIG. 1

2 / 11

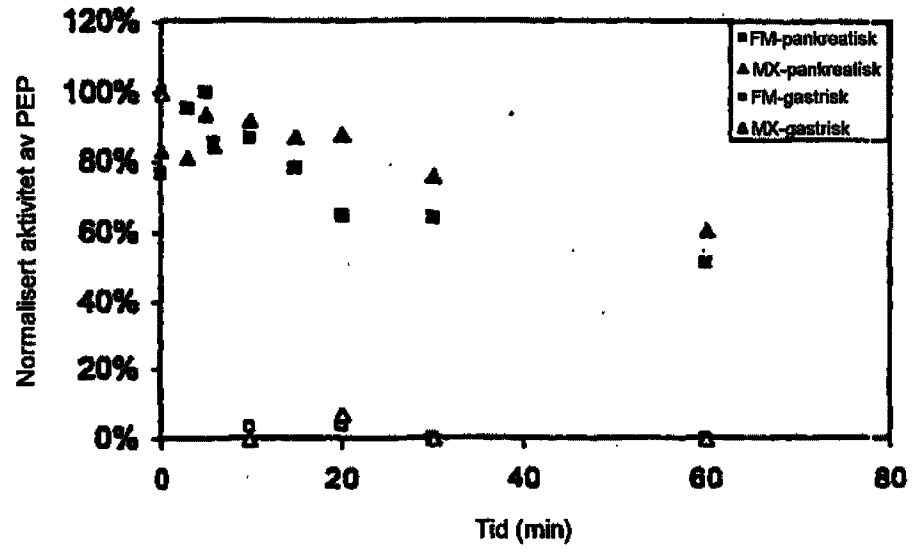


FIG. 2

3 / 11

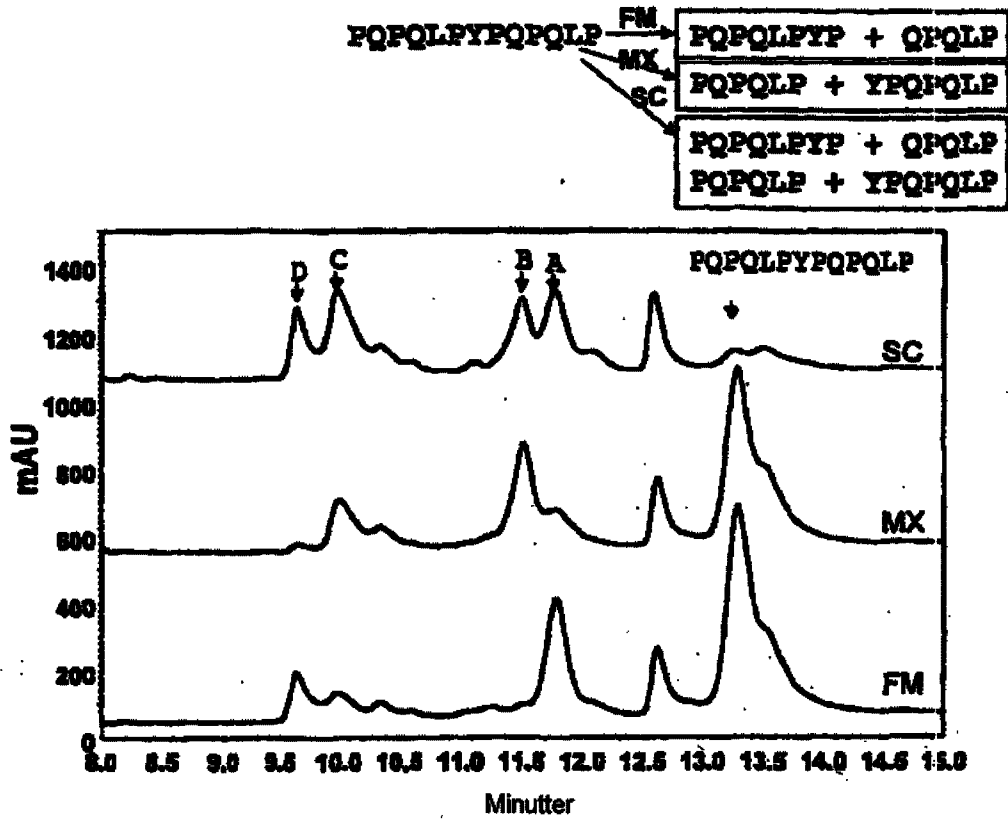


FIG. 3

4 / 11

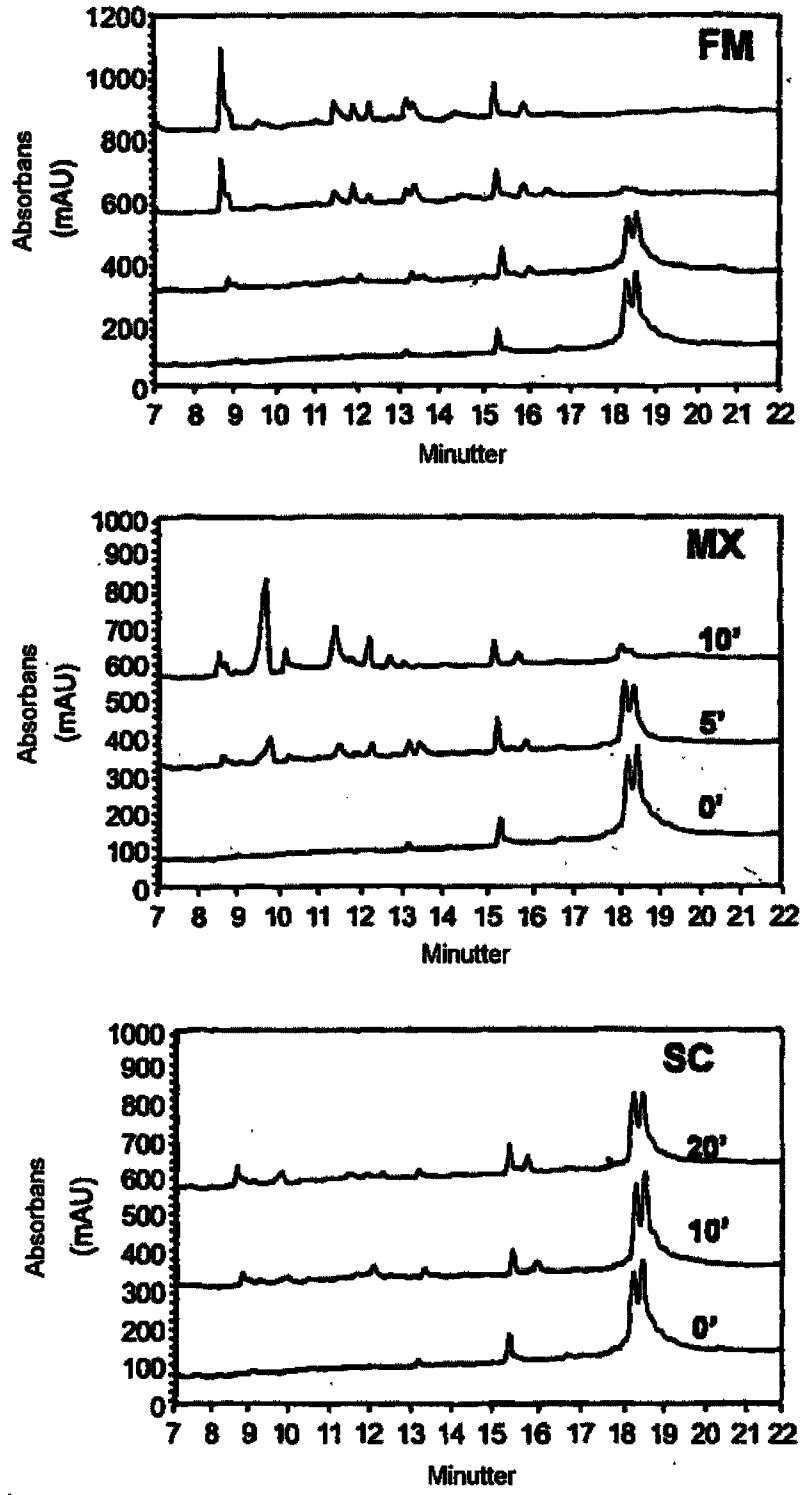


FIG. 4A

5 / 11

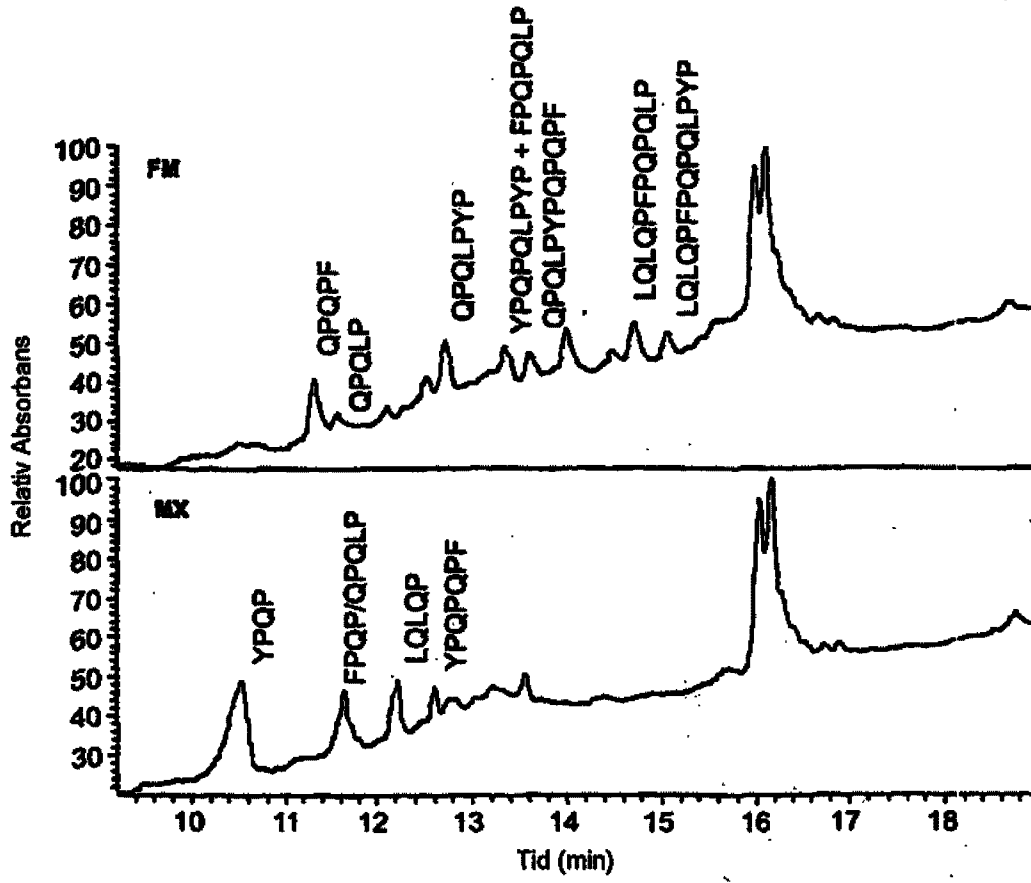


FIG. 4B

7/11

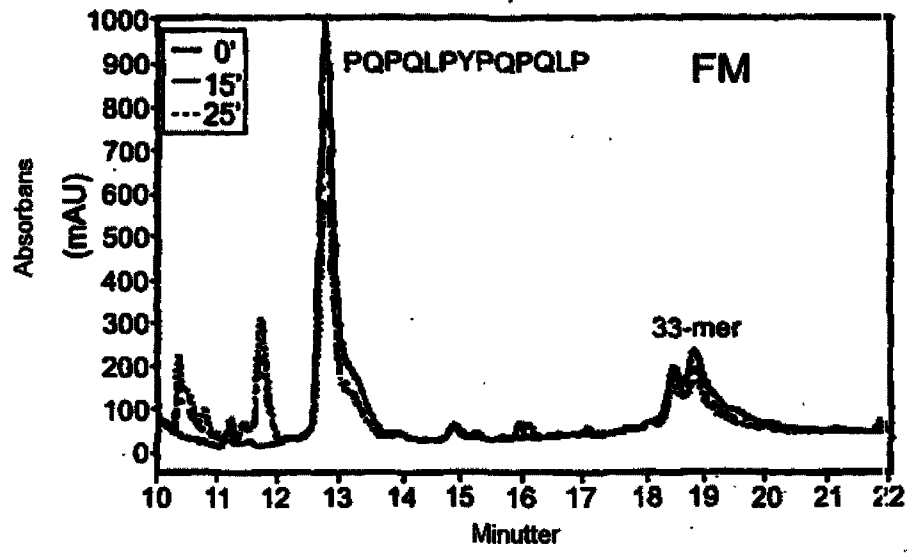


FIG. 5A

8 / 11

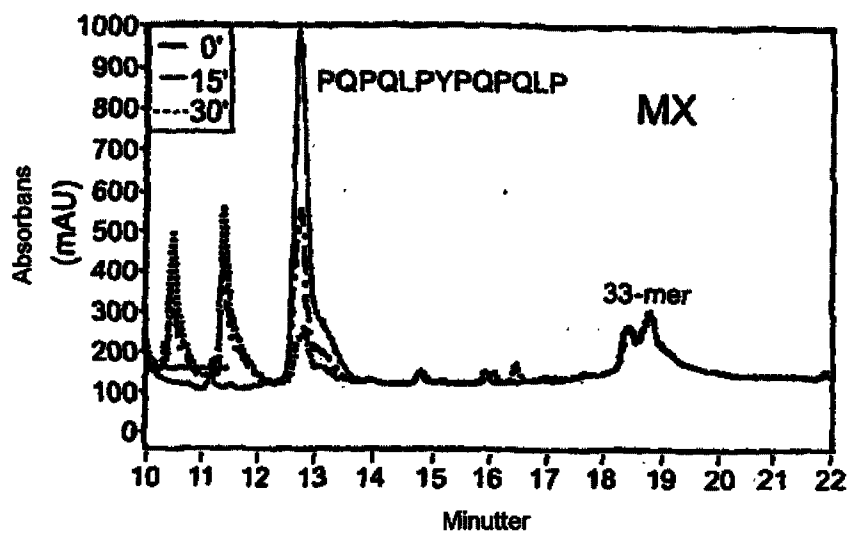


FIG. 5B

9 / 11

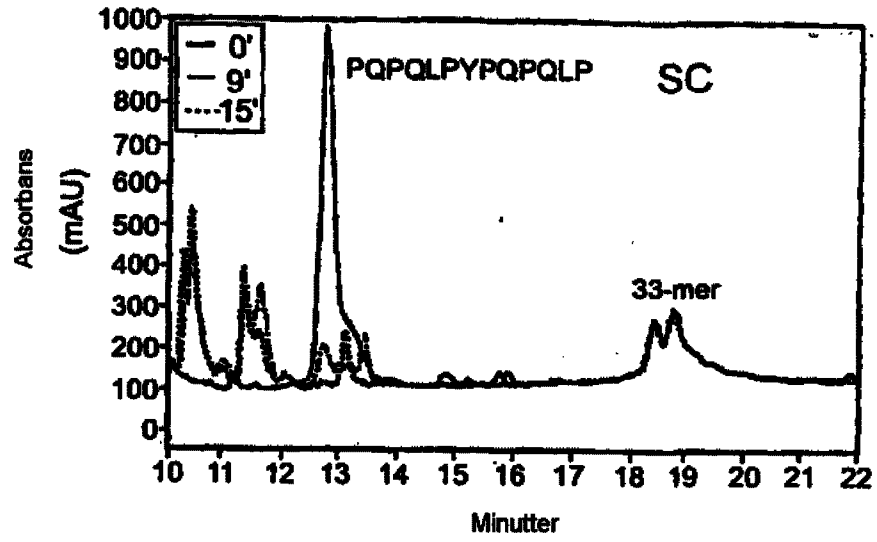
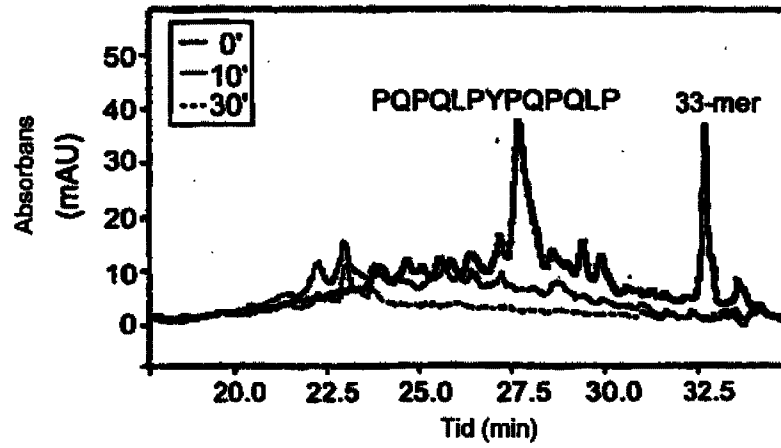


FIG. 5C

10 / 11

A.



B.

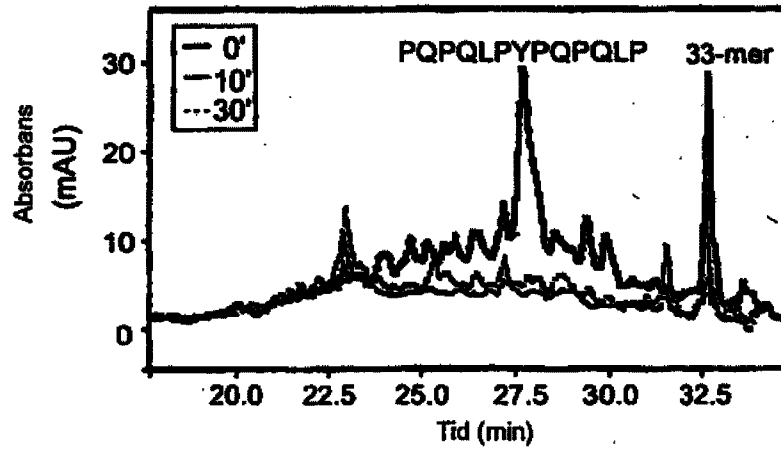


FIG. 6

11 / 11

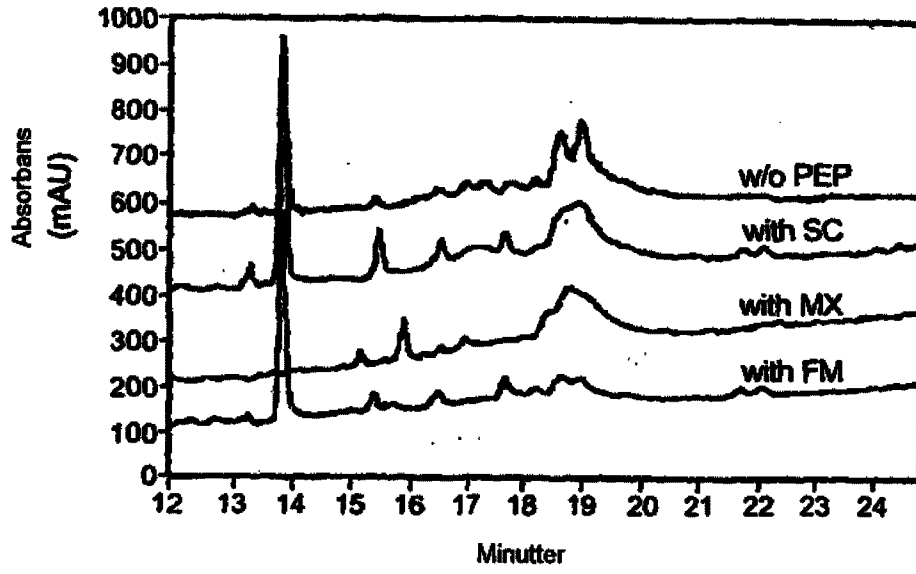


FIG. 7